

Kasper Villa

# Nestehiivan käyttö Stadin Panimo Oy:ssä

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Insinööri (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Insinöörityö

18.12.2015

Tekijä(t) Otsikko	Kasper Villa Nestehiivan käyttö Stadin Panimo Oy:ssä
Sivumäärä Aika	64 sivua + 3 liitettä 18.12.2015
Tutkinto	insinööri (AMK)
Koulutusohjelma	Bio- ja elintarviketekniikka
Suuntautumisvaihtoehto	Bioprosessien suunnittelu ja käyttö
Ohjaaja(t)	Lehtori Mikko Halsas Stadin Panimon omistaja Timo Konttinen
<p>Tämä insinöörityö tehtiin Stadin Panimo Oy:lle, joka on Helsingissä toimiva erikoisoluita valmistava pienpanimo. Työssä selvitettiin nestemäisen tuorehiivan käyttöä panimossa ja kahden valitun hiivakannan käymisnopeutta hiivausmäärän suhteen. Tuorehiivojen kasvatusta ja käyttö mahdollistaisi laajemman valikoiman erilaisia hiivakantoja panimon käyttöön. Nopeammat käymiset mahdollistaisivat suuremman tuotantomäärän ilman uusien käymistankkien hankintaa.</p> <p>Työn teoriaosassa käsitellään oluen raaka-aineita, valmistusta sekä nestemäisen hiivan käsittelyä panimossa. Kokeellisessa osassa suoritettiin kaksi hiivan koekasvatusta sekä hiivan käymisnopeutta mittaavia kokeita kahdella eri hiivakannalla. Kokeet suoritettiin Metropolia Ammattikorkeakoulun mikrobiologian laboratoriossa Vantaalla.</p> <p>Kokeiden perusteella saatiin hyvä käsitys siitä, kuinka paljon ja kuinka monessa vaiheessa hiivaa on panimolla propagoitava. Hiivan kasvatuksen aloittaminen panimolla vaatii laitehankintoja sekä henkilökunnan kouluttamista ja kasvatukseen perehdyttämistä. Kahden hiivakannan käymisnopeudesta saatiin suuntaa antavia tuloksia ja asian tutkiminen vaatii jatkoselvittelyä etenkin hiivausmäärän vaikutuksesta valmiin tuotteen flavoriin.</p>	
Avainsanat	Olut, hiiva, propagointi

Author(s) Title	Kasper Villa Use of liquid yeast in Stadin Panimo
Number of Pages Date	64 pages + 3 appendices 18 December 2015
Degree	Bachelor of Engineering
Degree Programme	Bio Technology and Food Engineering
Specialisation option	Design and Application of Bioprocesses
Instructor(s)	Mikko Halsas, Senior Lecturer Timo Konttinen, Owner of Stadin Panimo Oy
<p>This thesis was made for Stadin Panimo Oy, which is a micro brewery located in Helsinki. The aim of this thesis was to study the use of liquid yeast in the brewery and the relation between yeast pitch rates and fermentation speed with two selected yeast strains. Propagation and use of liquid yeast allows a wider range of yeast strains to be used in the brewery. Faster fermentation would allow higher production capacity without investments in new fermentation tanks.</p> <p>The theoretical part covers the raw materials and manufacturing process of beer and the handling of liquid yeast in the brewery. In the experimental part two test propagations were carried out, and several fermentations with selected yeast strains to measure fermentations speed. Experiments were conducted at the Helsinki Metropolia University of Applied Science's microbiology laboratory located in Vantaa.</p> <p>On the basis of the results of the test propagations a good overview was achieved regarding the amount of liquid yeast needed and number of necessary phases for the propagations at the brewery. Starting propagation of the yeast at the brewery requires new investments in propagation vessels and equipment and also training of the staff. Indicative results were obtained from the fermentation speed tests of two selected yeast strains. Further investigation is needed about the subject and especially on the influence of pitch rate to the flavor profile of the product.</p>	
Keywords	Beer, yeast, propagation

## Sisällys

1	Johdanto	3
2	Oluen raaka-aineet ja valmistus	3
2.1	Oluen raaka-aineet	3
2.1.1	Ohramallas	4
2.1.2	Muut uutelähteet	6
2.1.3	Humala	7
2.1.4	Vesi	8
2.1.5	Hiiva	8
2.2	Oluen valmistuksen vaiheet	10
2.2.1	Ohran mallastus	10
2.2.2	Maltaiden rouhiminen	11
2.2.3	Mäskäys	12
2.2.4	Siivilöinti	16
2.2.5	Vierteen keitto	17
2.2.6	Selkeytys ja jäähdytys	18
2.2.7	Hiivaus ja käyminen	19
2.2.8	Kypsytytys	21
3	Stadin Panimo	23
3.1	Valmistusprosessi	23
4	Hiivan käsittely ja laadunvalvonta pienpanimossa	26
4.1	Hiivan alkuperä	26
4.1.1	Kaupallinen toimittaja	27
4.1.2	Toiselta panimolta hankittava hiiva	27
4.1.3	Omat hiivakannat	27
4.2	Laitteisto	28
4.2.1	Hiivan propagoinnin laitevaihtoehdot	29
4.2.2	Säilytys propagoinnin jälkeen	31
4.3	Panimolaboratorio ja hiivan analysointi panimolla	32
4.3.1	Hiivan solumäärä ja elävyys	33
4.3.2	Elinkyky	35
4.3.3	Muita analyysejä	36

4.4	Hiivan propagointi panimolla	36
4.5	Talteenotto, säilyvyys ja uudelleenkäyttö	38
4.5.1	Talteenotto	38
4.5.2	Hiivan säilyvyys	40
4.5.3	Uudelleenkäyttö	41
	KOKEELLINEN OSUUS	43
5	Hiivakokeiden kulku	43
5.1	Koepropagointi	43
5.1.1	Ensimmäinen propagointi	43
5.1.2	Toinen propagointi	44
5.2	Käymiskokeet	44
5.2.1	American Ale II	45
5.2.2	WLP840	48
6	Tulokset ja tulosten tarkastelu	51
6.1	Propagointien tulokset	51
6.2	Käymiskokeiden tulokset	54
7	Yhteenveto	63
	Lähteet	64
	Liitteet	
	Liite 1. Hiivanäytteen solumäärän ja elävyyden määrittäminen	
	Liite 2. Elinkyky testit hiivalle	
	Liite 3. Hiivan kasvunopeuden ja generaatioajan laskeminen	

## 1 Johdanto

Tämän insinööriyön tavoitteena on selvittää nestehiivan käyttöönottoa Stadin Panimo Oy:ssä. Kirjallisessa osassa tutustutaan oluen raaka-aineisiin ja oluenvalmistuksen vaiheisiin Stadin Panimossa. Lisäksi perehdytään hiivaan sekä sen rooliin oluen valmistuksessa ja selvitetään menetelmiä nestehiivan käyttöön ja käsittelyyn pienpanimossa. Ensimmäisessä kokeellisessa osassa selvitetään, miten pienpanimossa voidaan kasvattaa riittävän suuri hiivasuspensio mahdollisimman yksinkertaisella prosessilla. Toisessa osassa selvitetään kahden valitun hiivakannan solumäärän vaikutusta vierteen käymisnopeuteen.

Stadin Panimo Oy on helsinkiläinen 1990-luvun lopulla perustettu pienpanimo ja se valmistaa suodattamattomia ja pastöroimattomia erikoisoluita. Panimo on tunnettu keikelevästä reseptiikastaan ja aromikkaista oluistaan. Insinööriyön tavoitteena on mahdollistaa yritykselle nestehiivojen käyttö tulevaisuudessa ja näin luoda mahdollisuus tuottaa monipuolisempia oluita nykyistä edullisemmin.

## 2 Oluen raaka-aineet ja valmistus

Tässä kappaleessa käydään läpi oluen valmistuksessa yleisesti käytetyt raaka-aineet ja valmistuksen vaiheet. Koska pienpanimoiden valmistusprosessit eroavat toisistaan joidenkin teknisten sovellusten osalta, niin tässä insinööriyössä keskitytään Stadin Panimon prosessiin.

### 2.1 Oluen raaka-aineet

Arkeologisten tutkimusten perusteella on todettu muinaisten sumerialaisten valmista-  
neen olutta ohrasta ja emmer-vehnästä 3500 vuotta ennen ajanlaskun alkua. Oluen valmistustaidon levitessä myöhemmin Eurooppaan käytettiin oluen valmistukseen myös spelttiä, ruista, kauraa, durraa, maissia, riisiä ja hirssiä. Ajan myötä ohra on kuitenkin vakiinnuttanut asemansa oluen pääraaka-aineena [Hornsey 1999: 1–15].

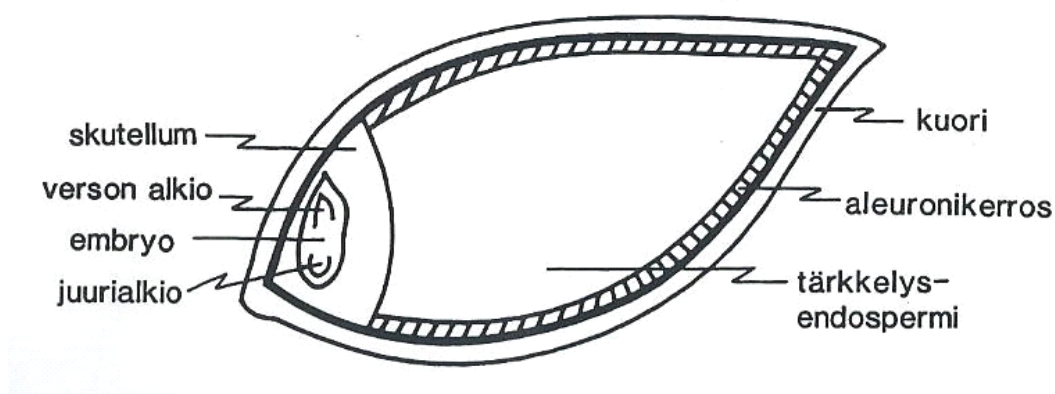
Vanhan, vuonna 1516 säädetyin saksalaisen oluen puhtauslain, *Reinheitsgebot*, mukaan oluen valmistuksessa ei saa käyttää mitään muuta kuin vettä, mallastettua ohraa ja humalaa. Määräyksen säätämishetkellä hiivan rooli oli tuntematon, eikä sitä mainittu alkuperäisessä määräyksessä. Hiiva lisättiin sallittujen raaka-aineiden listalle sen löytymisen jälkeen. Nykyaikana mallastetun ohran lisäksi käytetään muitakin viljoja sekä uutelahteita, kuten maissia ja riisiä sekä erilaisia mausteita. Jotkin panimot valmistavat olutta edelleen tämän vanhan määräyksen mukaan. [Briggs ym. 2004: 1–3; Eblinger & Narzib 2009: 179.]

Humalaa ei käytetty muinoin oluen mausteena kuten tänä päivänä, vaan humalan rooli oluen mausteena on vakiinnuttanut asemansa paljon myöhemmin. Aikaisemmin humalan sijaan oluen mausteena käytettiin muita mausteita sekä yrttejä, kuten suomyrttiä, pujoa, siankärsämöä, rosmariinia, inkivääriä ja monia muita paikallisesti saatavilla olleita ainesosia. [Hornsey 1999: 1–6.]

### 2.1.1 Ohramallas

Oluen valmistuksessa yleisin käytetty uutelahte on mallastettu ohra. Ohra kuuluu heinien sukuun (*Gramineae*) ja se kasvaa pohjoisen pallonpuoliskon leudoilla ilmastoalueilla. Ohrat lajitellaan aluksi kahteen ryhmään: kevät- ja syysohraan. Kevätohra kylvetään keväällä ja syysohra myöhään syksyllä. Ohrat jaotellaan edelleen kaksi- ja monirivisiin sen mukaan, kuinka monessa rivissä tähkät korressa ovat. [Briggs ym. 2004: 11; Eblinger & Narzib 2009: 195–197; Enari & Mäkinen 2015: 15.]

Ohran jyvä koostuu kahdesta osasta, embryosta eli alkiosta sekä tärkkelysendospermistä. Kuvassa 1. on esitetty ohrajyvän läpileikkaus. Embryo sijaitsee jyvän päässä ja sitä ympäröi skutellum. Skutellum absorboi ja muuntaa ravinteita embryolle itämisen aikana. Itämisessä embryoon muodostuu kasvavan uuden ohran lehdet ja juuret. Tärkkelysendospermi on jyvän vararavintoa kasvamiseen ja koostuu pääosin tärkkelysjyväsistä ja liukenemattomista varastoproteiineista. Tärkkelysendospermiä ympäröi 2–4 solun paksuinen aleuronikerros. Ohran jyvän itäessä skutellumissa ja aleuronikerroksessa syntetisoituu hydrolysoivia entsyymejä ja ne erittyvät tärkkelysendospermiin. Koko jyvää ympäröi kuori. [Enari & Mäkinen 2015: 18–20.]



Kuva 1. Lämpileikkaus ohran jyvästä. [Enari & Mäkinen 2015: 18]

Ennen kuin ohra voidaan panna olutta, se mallastetaan. Mallastuksessa ohraa liotetaan kunnes se alkaa itämään. Kun itäminen on alkanut, ohra siirretään idätyslaariin, jossa sen annetaan itää kunnes on saavutettu sopiva möyhentymisaste. Möyhentyneisyys tarkoittaa jyvän rakenteen pehmentymistä. Itäminen kestää möyhentymisasteesta ja lajikkeesta riippuen 5–7 vuorokautta. Tämän jälkeen itäminen keskeytetään paahtamalla jyviä eri lämpötilaohjelmilla valmistettavasta mallastyypistä riippuen. [Home. 2012. Verkkodokumentti. Luettu 26.11.2014.]

Sytä ohran suosioon on monia. Ohran sopivuus kosteisiin viljelyolosuhteisiin on varmistanut sen leviämisen laajalle alueelle. Ohran kuori ei irtoa puinnissa, mikä suojaa itua mallastuksessa. Idun suojaamisen lisäksi kuori edesauttaa vierteen kirkastamista muodostamalla suodattavan kerroksen. Tärkein ominaisuus mallastettavalle viljalle on kuitenkin sen hyvä itävyys, alhainen liisteröitymislämpötila sekä entsymaattinen aktiivisuus. Ilman itämistä välttämättömiä entsyymejä ei muodostu mallastuksessa. Tärkkelyksen liisteröityessä se liukenee veteen ja entsyymit pilkkovat tärkkelyksen tehokkaasti hiivalle sopivaan muotoon. Ohrasta valmistettu vierre sisältää hiivalle välttämättömät käymiskelpoiset sokerit, liuenneet typpiyhdisteet, kivennäisaineet ja osan hiivan tarvitsemista rasvahapoista. [Briggs ym. 2004: 11; Enari & Mäkinen 2015: 15, 76; Huttunen ym. 2010: 204]

Ohrasta valmistetaan lukuisia erityyppisiä maltaita muuttamalla mallastusprosessia. Nostamalla jyvien kuivauslämpötilaa saadaan Maillard-reaktion avulla aikaan erilaisia karamelli- ja värimaltaita. [Huttunen ym. 2010: 204–206]



Edellä mainittujen viljojen lisäksi uutelähteenä voidaan käyttää mallastamattomia viljoja, niiden hiutaleita, jauhoja ja siirappeja. Hiutaleita valmistetaan muun muassa vehnästä, kaurasta, maissista ja riisistä. Käyttämällä muita tärkkelyksen lähteitä kuin mallassohraa, kuten siirappeja, voidaan vaikuttaa vierteen koostumukseen ja valmiin oluenrunkoon. [Briggs ym. 2004: 2; Enari & Mäkinen 2015: 43, 76.]

### 2.1.2 Muut uutelähteet

Olutta voidaan valmistaa periaatteessa mistä tahansa uutelähteestä. Ohran lisäksi käytettyjä viljalajeja ovat mm. vehnä, riisi, kaura, ruis, maissi ja durra. Ohramallasta korvaava uutelähde voidaan lisätä olueeseen maltaan, jauhon, rikotun jyvän tai lastun muodossa. [Eblinger & Narzib 2009: 180–181; Hornsey 1999: 48–50]

Vehnää (*Triticum aestivum*) käytetään oluen valmistuksessa sekä mallastettuna että mallastamattomana. Joissain olut-tyypeissä suurin osa mallaspohjasta on vehnää, esimerkiksi saksalaisessa *Weißbier*-oluessa. Vehnän endospermin soluseinät sisältävät korkeita määriä pentosaaneja, jotka aiheuttavat valmiissa oluessa sameusongelmia. Tämän johdosta vehnän määrä ei yleensä ole enempää kuin 20 %. Vehnän tärkkelyksen liisteröitymislämpötila on 52–64 °C:ta, minkä johdosta vehnää voidaan lisätä suoraan maskäyskattilaan ilman esikeittämistä. Ruista ja kauraa käytetään pikemmin tuomaan oluelle makua kuin halpana uutelähteenä. Kauran liisteröitymislämpötila on 52–64 °C:ta ja rukiin 49–61 °C:ta. [Hornsey 1999: 48–50, Briggs ym. 2004: 38]

Riisi liisteröityy ohraa korkeammassa lämpötilassa 65–80 °C:ssa, minkä takia se on esikäsiteltävä ennen maskäystä. Riisiä käytetään koska se on halpaa ja sillä on korkea uutepitoisuus. Riisiä käytetään etenkin Light-oluissa keventämään oluen väriä ja runkoa [Hornsey 1999: 48–50]. Maissia käytetään samoista syistä kuin riisiä eli hyvän uutesaannon ja edullisen hinnan vuoksi. Olueen käytettävästä maissista poistetaan alkiot koska ne sisältävät oluen vaahtoon heikentävästi vaikuttavia lipidejä. Maissin liisteröitymislämpötila on 62–77 °C:ta, joten maissi on esikeitettävä ennen maskäystä. [Briggs ym. 2004: 38; Eblinger & Narzib 2009: 181; Hornsey 1999: 49]

### 2.1.3 Humala

Humala (*Humulus lupulus*) on monivuotinen, ruhovartinen köynnöskasvi. Ensimmäiset dokumentoidut humalaviljelmät sijaitsivat Saksassa Baijerin alueella 700-luvun alkupuolella. Humalaa käytettiin oluen valmistuksessa ensisijaisesti pidentämään sen säilyvyyttä. Humala antoi oluelle myös miellyttävän maun ja tuoksun, ja se on vakiinnuttanut asemansa oluen raaka-aineena. [Hornsey 1999: 58–59]

Humala on kaksikotinen, mikä tarkoittaa sitä, että humalan heteet (uros) ja emit (naaras) ovat eri yksilöissä. Hedelmöittyessään uroskasvin siitepölystä naaraspuolinen kasvi tuottaa emikukintoja, jotka muistuttavat ulkomuodoltaan pieniä käpyjä. Käpyjen sisältä on pieniä kellertäviä jyväsiä, lupuliinijyväsiä. Nämä jyvät sisältävät kaikki oluen valmistuksessa halutut ainesosat. Kasvi tuottaa emikukintoja myös hedelmöittymättömänä. Neitseelliset emikukinnot sisältävät enemmän aromaattisia aineita kuin katkeroita. Tämä on johtanut käytäntöön, missä eri olut-tyylien valmistajat suosivat joko hedelmöittyneitä tai hedelmöittymättömiä emikukintoja. [Briggs ym. 2004: 228–230; Hornsey 1999: 59–62]

Lupuliinijyvästen sisältämät oluelle merkittävät ainesosat jaetaan katkeroaineisiin ja humalaöljyihin [Enari & Mäkinen 2015: 70–72]. Katkeroaineet jaetaan edelleen pehmeisiin ja koviin hartseihin sen mukaan liukenevatko ne heksaaniin. Heksaaniin liukenevat hartsit, pehmeät hartsit, sisältävät  $\alpha$ - ja  $\beta$ -happoja.  $\alpha$ -hapon tärkeimmät hartsit ovat humuloni, kohumuloni sekä adhumuloni ja vastaavasti  $\beta$ -hapon tärkeimmät hartsit ovat lupuloni, kolupuloni sekä adlupuloni. Vierteen keitossa  $\alpha$ -hapot muuttuvat iso- $\alpha$ -hapoiksi, joista oluen merkittävin katkeroaine on isohumuloni. Kovat hartsit ovat pehmeiden hartsien hapettumistuotteita ja niitä on enemmän vanhassa humalassa, jolloin niillä voi olla vaikutus oluen katkeroaineiden muodostumiseen keitossa. [Briggs ym. 2004: 255–258 ; Enari & Mäkinen 2015: 70–72; Hornsey 1999: 71–75]

Modernien kemiallisten määritysmenetelmien avulla humalaöljyistä on erotettu yli 300 erilaista yhdistettä, jotka jaetaan edelleen kolmeen ryhmään; hiilivetyihin ja kemiallisesti sitoutuneisiin happi- ja rikkiyhdisteisiin. Hiilivedyt muodostavat 50–80%:a öljyjen kokonaismäärästä kun taas happiyhdisteitä on 20–50%:a ja rikkiyhdisteitä alle 1%:. [Hornsey 1999: 75–76]

Katkeroaineet antavat oluelle selvästi tunnistettavan kitkerän maun. Humalaöljyt saavat aikaan oluelle tyypillisen aromin ja vaihtelemalla käytettävän humalan lajiketta, määrää, lisäysajankohtaa sekä yhdistelemällä eri humalalajikkeita oluen panija voi luoda olueen loputtoman määrän erilaisia makuja ja tuoksuja. [Hornsey 1999: 71–80]

#### 2.1.4 Vesi

Olut sisältää vettä 89–98%:a riippuen oluttyylistä ja erityisesti oluen alkoholipitoisuudesta. Oluen panossa käytettävän veden tulisi olla hajutonta, mautonta ja väritöntä, myös veden mikrobiologisella laadulla ja sen sisältämien mineraalien määrällä on merkittävä vaikutus oluen makuun ja ominaisuuksiin. Perinteiset oluenvalmistusalueet kuten Pilsen, Munich ja Burton ovat tunnettuja tietynlaisen olut-tyylin valmistuksesta. Tämä johtuu suurelta osin alueilla käytössä olleen veden laadusta; Pilsenissä vesi on hyvin pehmeää, minkä takia se soveltuu erinomaisesti vaaleiden Lager-oluiden valmistukseen. Englannin Burton-on-Trent on vuorostaan tunnettu Pale-ale oluistaan, jotka on parasta valmistaa kovaan veteen. Alueiden vedenlaadulla on ollut merkittävä rooli valmistettujen oluiden kehittämisessä. [Briggs ym. 2004: 52–54]

Pienpanimot ottavat käyttövetensä tyypillisesti vesijohtoverkosta ja joissain tapauksissa omasta lähteestä. Omasta lähteestä otetun veden laatu voi vaihdella ajoittain. Nykyään monet suuret panimot tarkkailevat käyttövetensä laatua ja mineraalien määrää varmistakseen tasalaatuisen tuotannon. Suuret panimot myös säätävät veden mineraalien, kalsiumin, magnesiumin ja karbonaattien pitoisuutta saadakseen vedestä mieleistään kulloiseenkin käyttötarpeeseen. Toisin kuin suuret panimot, pienpanimot tyytyvät käyttöveiteensä usein sellaisenaan. Veden kovuutta ja pH:ta voidaan kuitenkin säätää lisäämällä veteen edellä mainittuja mineraaleja sekä happoja. Mineraaleilla vaikutetaan veden ionipitoisuuksiin sekä mäsäyksen pH-arvoon ja hapoilla lähinnä pH-arvoon. [Briggs ym. 2004: 52–60; Markkula 2007: 12–13]

#### 2.1.5 Hiiva

Hiivan roolia valmistusprosessissa ei tunnettu kunnolla kuin vasta 1830-luvulla. Ennen hiivan roolin tuntemusta on oluen valmistusprosessissa käytetty lähinnä erilaisia villihiiva-kantoja, jotka päätyivät valmistettuun vierteeseen ympäristöstä, raaka-aineiden mukana tai käytettyjen astioiden pinnoilta. Vasta myöhemmin hiivan tunnistaminen ja sen

roolin ymmärrys johti puhtasviljelmien kehittämiseen ja tarkoituksenmukaisemman hiivan lisäämiseen vierteen joukkoon. [Walker 2000: 7; Hornsey 1999: 1–6]

Panimohiiva (*Saccharomyces cerevisiae*, *S. carlsbregensis*) on yksisoluinen sieniin luokiteltava organismi ja se lisääntyy vegetatiivisesti kuroutumalla. Panimohiivat ovat fakultatiiveja, eli ne pystyvät elämään sekä hapellisissa että hapettomissa olosuhteissa. Oluenvalmistuksen kannalta hapettomassa tilassa tapahtuva aineenvaihdunta on tärkeämpi, sillä hiivan fermentoidessa sokereita hapettomissa olosuhteissa syntyy metaboliatuotteina etanolia sekä hiilidioksidia. Lämpötilavaatimuksiltaan hiiva on mesofiili, sen optimi kasvulämpötila on 20–40 °C. Eri hiivakantojen välillä on kuitenkin suuria eroja lämpötilaoptimin suhteen. Hiivat sietävät happamia olosuhteita; kasvua esiintyy vielä pH:ssa 4, mutta sitä happamammissa olosuhteissa kasvu hidastuu tai pysähtyy; optimaalinen pH on 5,3. Käymisen aikana pH laskee noin yhden pH yksikön verran, mikä suojaa valmista olutta kontaminaatioilta, sillä vain harvat bakteerilajit pystyvät lisääntymään pH:ssa alle 4,5. [Enari & Mäkinen 2015: 102–103, 107; Hornsey 1999: 112–113.]

Hiiva tarvitsee ravinnokseen riittävän määrä sokereita, typpeä, vitamiineja, fosforia ja hivenaineita. Tarkat ravintovaatimukset vaihtelevat Ale- ja Lager-hiivojen sekä eri kantojen välillä. Ravintovaatimukset voivat vaihdella myös panimoittain, vaikka käytössä olisi sama hiivakanta. [White & Zainasheff 2010: 72–73.]

Maltaasta valmistettu vierre sisältää kaikkia hiivalle tarpeellisia ravinteita paitsi happea ja sinkkiä. Happea hiiva tarvitsee kasvuvaiheessa soluseiniensä muodostamiseen ja sinkkiä lisääntymiseen. Sinkillä on myös rooli hiivan dehydrogenaasi-entsyymin toiminnassa, joka vastaa alkoholin muodostuksesta solussa. Hiivan fermentointi- ja stressinsietokykyä voidaan parantaa optimoimalla vierteen koostumusta lisäämällä sopivia ravinteita. [White & Zainasheff 2010: 74–75.]

Panimoteollisuudessa hiivat jaetaan käytännössä kulttuurihiivoihin ja villihiivoihin ja edelleen pinta- ja pohjahiivoihin. Erottelu pinta- ja pohjahiivoihin perustuu hiivan käyttäytymiseen käymisen aikana ja sen lopussa; pohjahiivat flokkaantuvat ja painuvat käymisastian pohjalle kun taas pintahiivat nousevat oluen pinnalle. Flokkaantuminen johtuu hiivan soluseinästä ja sen sisältämästä fosfomannaanista, joka sitoo itseensä kalsiumioneja ja muita kaksiarvoisia ioneja. Kalsiumionit muodostavat kalsiumsiltoja

sitoen hiivasoluja yhteen jolloin ne vajoavat pohjalle. Pintahiivoilla flokkaantuminen ei ole erilaisesta soluseinästä johtuen yhtä voimakasta. Pintahiivalla valmistettua olutta kutsutaan Ale-olueksi ja pohjahiivalla valmistettua Lager-olueksi. [Enari & Mäkinen 2015: 112–113, 117–118; Hornsey 1999: 99–103.]

## 2.2 Oluen valmistuksen vaiheet

Olen valmistus alkaa käytettävän viljan mallastamisella. Mallastus on kokonaisuudessaan eri prosessi ja nykypäivänä useimmat panimot ostavat ohran valmiiksi mallastettuna kauppamallastamoista. Mallastettu ohra rouhitetaan ja mäskätään, valmis mäski siivilöidään ja siitä erotettu vierre keitetään humalan kanssa. Keitetty vierre kirkastetaan ja jäähdytetään, minkä jälkeen se fermentoidaan hiivalla. Fermentoinnin jälkeen olut kypsytetään ennen pullotusta. [Eblinger & Narzib 2009: 195–196; Huttunen ym. 2010: 205.]

### 2.2.1 Ohran mallastus

Ohran mallastus jaetaan kolmeen vaiheeseen; liotukseen, idätykseen ja kuivaukseen, missä prosessin ohjaus perustuu lämpötilan, kosteuden ja ilman virtauksen säätöön. Mallastuksen tarkoituksena on saada ohra itämään, jolloin syntyy entsyymejä, jotka pilkkovat endospermin sisältämän tärkkelyksen mäskäyksessä liukenevaan muotoon. Mallastuksen lopuksi jyvät kuivataan eri lämpötiloissa lopullisen mallastustyyppin mukaan. [Enari & Mäkinen 2015: 22–23.]

Mallastus alkaa jo pelloilta, kun valitaan viljeltävä ohralajike ja kylvämisaika. Suurin osa suomessa viljeltävästä mallasohrasta on kaksitahoista kevätohraa, jota viljellään sopimusviljelynä. Puinnin aikaan ohran kosteuspitoisuus on n. 20 % ja se lasketaan maatilalla vähintään 13,5 %:iin ennen toimitusta mallastamoon. Ohran saapuessa mallastamoon se esipuhdistetaan vieraista esineistä, minkä jälkeen kosteuspitoisuus tarkistetaan. Mahdollisen kuivauksen jälkeen erä puhdistetaan pölystä ja siitä erotellaan vieraat jyvät. Lopuksi jyvät jaetaan koon mukaan kolmeen osaan ja ne varastoidaan siiloihin. Jyviä pitää varastoida 2–5 kk, koska ne ovat puimisen jälkeen lepotilassa, jolloin jyvät eivät lähde itämään, vaikka kosteus ja lämpötila olisivat oikeat. [Enari & Mäkinen 2015: 16–17, 23.]

Varastoinnin jälkeen aloitetaan mallastuksen ensimmäinen vaihe, liotus, jossa ohran kosteuspitoisuus nostetaan 43–35 %:iin 11–15 °C vedellä. Liotusvettä ilmastetaan ja vaihdetaan prosessin aikana koska ohra kuluttaa happea soluhengitykseen. Kun juuri-idut alkavat näkyä, ohra on valmista idätykseen. [Enari & Mäkinen 2015: 23.]

Idätyksessä syntyy entsyymejä, jotka hydrolysoivat, eli pilkkovat, endospermin sisältämät ravinteet (tärkkelyksen ja proteiinit) sellaiseen muotoon, että niitä voidaan käyttää kasvavan alkion soluaineen tuottamiseen. Oluenvalmistuksen kannalta tärkeintä on entsyymien muodostuminen ja endospermin muuttuminen helposti jauhautuvaan muotoon, eli möyhentyminen. Tärkeimmät idätyksessä syntyvät entsyymit ovat tärkkelystä pilkkovat amylaasit, proteiineja ja peptidejä pilkkovat proteinaasit ja peptidaasit ja  $\beta$ -glukanaa pilkkovat glukanaasi. [Enari & Mäkinen 2015: 23–25.]

Kun ohran itäminen on saavuttanut halutun asteen, se lopetetaan kuivaamalla ns. vihermallas ja poistamalla samalla juuri-idut. Kuivaaminen tapahtuu yleisesti kuumalla ilmalla ja kuivauksen lämpötila-aika profiili riippuu valmistettavan maltaan tyypistä. Eri-laisia maltaita voidaan valmistaa pitämällä sokeroitumistaukoja entsyymien toimintalämpötiloissa ja sitten paahtamalla maltaita. Korkeissa lämpötiloissa sokerit karamelloituvat ja sen lisäksi tapahtuu sokereiden ja aminohappojen välillä Maillard-reaktioita, joista muodostuu maltaille tyypillisiä flavoriyhdisteitä ja väriaineita, melanoidiineja. Esimerkiksi yleinen perusmallas, pilsner-mallas, kuivataan 70–90 °C loppulämpötilaan ja tummien värimaltaiden tyypillinen loppulämpötila on jopa 200–225 °C. [Enari & Mäkinen 2015: 29.]

### 2.2.2 Maltaiden rouhiminen

Oluenvalmistuksessa käytettävän maltaan rakenne on rikottava sokerisaannon parantamiseksi mäskäyksessä sekä sujuvan siivilöinnin varmistamiseksi. [Eblinger & Narzib 2009: s. 195–197.]

Maltaiden rouhimisella tarkoitetaan jyvän rakenteen rikkomista. Prosessissa, jossa käytetään siiviläammetta vierteen erottamiseen mäskistä, jyvien kuoret halutaan säilyttää mahdollisimman ehjinä, koska niiden tehtävänä on muodostaa varsinainen suodattava kerros jolloin siivilöinti tapahtuu nopeammin ja erotettu vierre on kirkkaampaa. Rouhimisen toinen tehtävä on jauhaa jyvän sisällä sijaitseva tärkkelysjyvänen ja alkio. Ylei-

nen tekniikka jyvien rouhimiseen on ns. valssimylly, jossa on kahdesta kuuteen sileää tai uritettua valssia lähellä toisiaan. Jyvät syötetään valssien väliin ja niiden etäisyyttä säätämällä määritellään kuinka hienoksi mallas rouhitaan. Myllyssä, jossa on useampi valssipari, voidaan jyvien kuoret seuloa erilleen jyvän muusta osasta. Alkio ja endospermi johdetaan seuraavan valssiparin läpi ja jauhetaan hienommaksi. Näin jyvien jauhatusaste saadaan korkeammaksi kuitenkin jauhamatta liikaa jyvän kuoria. [Eblinger & Narzib 2009: 196–197; Hornsey 1999: 30–31]

Jyvät voidaan rouhia kuivana tai märkänä. Kuivana rouhittaessa mallas pölyä voimakkaasti, joten pölyräjähdysten riski on otettava huomioon. Märkärouhinnassa jyvien kosteusprosentti nostetaan juuri ennen myllyä noin 30 %:iin. Kosteaa jyvää puristuu valssin läpi niin, että kuoret lohkeavat irti jyvistä ja vettynyt endospermi ja alkio puristuvat ulos lietteenä. Liete ja kuoret siirretään välittömästi mäskäysastiaan. Märkärouhinnalla pyritään vähentämään pölyräjähdysten riskiä sekä lisäämään mäskäyksen saantoa ja parantamaan suodatettavuutta. [Hornsey 1999: 30–31]

Stadin Panimo ostaa perusmaltaansa valmiiksi rouhittuna kaupalliselta mallastajalta 20 kg:n säkeissä. Sellaisia erikoismaltaita, joita ei ole saatavilla rouhittuna, panimo rouhii itse käsikäyttöisellä valssimyllyllä. Suurien mallasmäärien rouhiminen vie aikaa ja tuottaa suuria määriä mallaspölyä. Tilaamalla maltaat rouhittuna, panimo säästää aikaa prosessissa. [Gren 2015].

### 2.2.3 Mäskäys

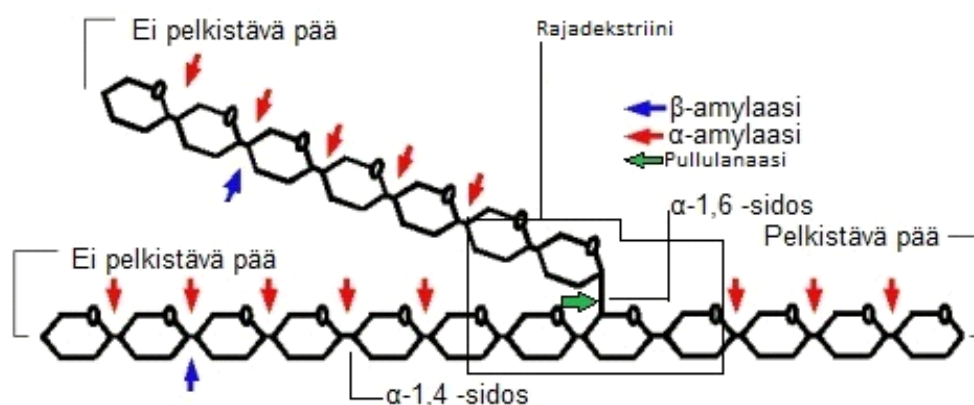
Mäskäyksen tavoitteena on saada aikaan sokeripitoinen vierre, joka sisältää hiivalle sopivia sokereita sekä tyyppä ja rasvahappoja. Vierteeseen pitää olut-tyypistä riippuen jäädä myös käymiskelvottomia sokereita tuomaan suutuntumaa. Vierteen koostumus riippuu käytetyistä uutelahteista ja niiden laadusta, mäskäyksen lämpötila-aika-profiilista, pH:sta ja veden laadusta. [Enari & Mäkinen 2015: 84; Hornsey 1999: 31–32.]

Mäskäyksessä rouhittu mallas sekoitetaan veden kanssa; maltaan ja veden suhde vaihtelee käytettävästä laitteistosta, sekoitustavasta ja mäskäysmenetelmästä riippuen. Erilaisia mäskäysmenetelmiä ovat mm. kolmi-, kaksi- ja yksivaiheittomäskäys, ohjelmoitu infuusiomäskäys ja infuusiomäskäys vakio- lämpötilassa. [Enari & Mäkinen 2015: 96, 101]

Normaali vesimäärä mallaskiloa kohti on 2–5 litraa. Tärkkelyksen, proteiinien ja muiden biopolymeerien pilkkoutumisen ja liukenemisen veteen saavat aikaan maltaan omat entsyymit. Entsyymit ovat muodostuneet maltaaseen mallastusprosessissa tapahtuneen itämisen johdosta. Tärkeimmät tärkkelystä pilkkovat entsyymit ovat  $\alpha$ - ja  $\beta$ -amylaasi. Tärkkelyksen hydrolyysin lisäksi mäsäyksessä pilkkoontuu maltaan proteiineja sekä  $\beta$ -glukaania. [Enari & Mäkinen 2015: 84–85; Hornsey 1999: 31–32.]

Ohramaltaan tärkkelys koostuu amyloosista sekä amylopektiinistä. Amyloosia on tärkkelyksen määrästä 20 % ja amylopektiiniä 80 %. Amyloosi ja amylopektiini muodostavat 98 % tärkkelysjuväsen kuivapainosta ja loput 2 % muodostuu proteiineista, lipideistä ja  $\beta$ -glukaanista. Amyloosi koostuu glukoosimolekyyleistä jotka muodostavat  $\alpha$ -1,4-sidoksilla suoran glukoosipolymeerin.  $\beta$ -amylaasi pilkkoo amyloosin glukoosiketjun ei-pelkistävästä päistä kahden glukoosin mittaista disakkaridia, maltoosia. Myös amylopektiini koostuu glukoosimolekyyleistä jotka ovat sitoutuneet  $\alpha$ -1,4-sidoksilla, minkä lisäksi amylopektiini haarautuu  $\alpha$ -1,6-sidoksilla muodostaen haarakohtia, joihin  $\beta$ -amylaasin toiminta pysähtyy ja syntyy käymiskelvottomia rajadekstriinejä.  $\alpha$ -amylaasi pilkkoo tärkkelysketjua satunnaisista kohdista vapauttaen samalla lisää tärkkelysketjun päitä  $\beta$ -amylaasin pilkottavaksi.  $\alpha$ -1,6-sidoksia sisältäviä rajadekstriinejä jää jäljelle  $\alpha$ - ja  $\beta$ -amylaasien toiminnan jälkeenkin. Nämä rajadekstriinit voidaan pilkkoa edelleen mikrobiperäisellä pullulanaasilla. Vaikka maltaan tärkkelyksen hydrolysoituminen kokonaan olisi mahdollista, näin ei kuitenkaan oluen valmistuksessa tehdä. Olut-tyylistä riippuen vierteeseen halutaan sopivia määriä käymiskelvottomia sokereita tuomaan makua ja runkoa lopputuotteeseen. Tärkkelyksen hydrolysoitumisastetta voidaan säädellä lämpötilan avulla. Sekä  $\alpha$ - että  $\beta$ -amylaasilla on omat optimilämpötilansa;  $\alpha$ -amylaasin optimilämpötila on 72–75 °C:ta ja  $\beta$ -amylaasin 62–65 °C:tta. Oluen rungosta saadaan paksu esimerkiksi ohittamalla  $\beta$ -amylaasin optimilämpötila nopeasti ja pysäyttämällä lämpötila  $\alpha$ -amylaasin optimilämpötilaan. Näin syntyy paljon dekstriinejä, jotka eivät hydrolysoitu edelleen käymiskelpoisiksi sokereiksi, koska  $\beta$ -amylaasi on inaktivoitunut. Kuvassa 2 on esitetty kuinka  $\alpha$ -,  $\beta$ -amylaasi ja pullulanaasi pilkkovat tärkkelystä eri sidosten kohdalta. [Adams & Moss 2008: 349–350; Enari & Mäkinen 2015: 84–86.]





Kuva 2. Tärkkelyksen pilkkoutuminen. [Starch Conversion 2010.] Muokannut Kasper Villa.

Ohramallas sisältää suurimolekyyllistä  $\beta$ -glukaania, joka nostaa vierteen viskositeettiä aiheuttaen suodatus- ja siivilöintiongelmia.  $\beta$ -glukaanipitoisuus riippuu käytettävästä mallaslajikkeesta ja kasvuolosuhteista. Myös maltaan möyhentyneisyydellä on vaikutusta  $\beta$ -glukaani molekyylin kokoon. Maltaan endo-  $\beta$ -glukanaasi pilkkoo näitä molekyylejä pienempään muotoon tehokkaasti 40–45 °C:n lämpötilassa ja liian lyhyt tauko tässä lämpötilassa pidentää siivilöintiaikaa ja aiheuttaa myöhemmin suodatusvaikeuksia, jos maltaan möyhentyneisyysaste on jäänyt alhaiseksi. Mäskäystauko alhaisessa lämpötilassa (<50 °C) on tarpeen, jos maltaiden möyhentyneisyys todetaan huonoksi. [Enari & Mäkinen 2015: 88.]

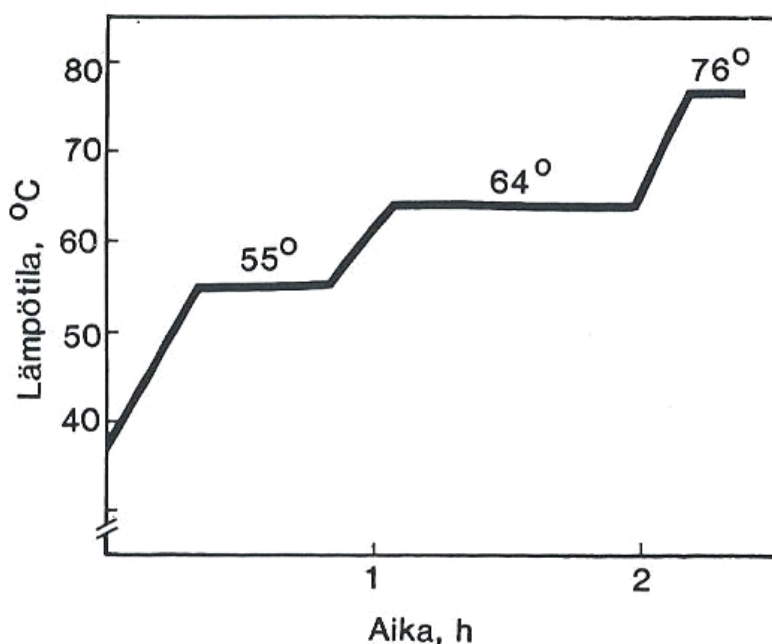
Hiiva tarvitsee ravinnokseen vapaata aminotyyppiä ja sen puute vierteessä johtaa hitaaseen käymiseen ja makuvirheisiin. Vierteessä, jonka sokeripitoisuus on 11–12 %:a, olisi oltava vähintään 140 mg/l vapaata aminotyyppiä [Enari & Mäkinen 2015: 78]. Täysmallasoluessa kaikki tarvittava aminotyyppi saadaan maltaan omista proteiineista, joiden hajoaminen peptideiksi ja aminohapoiksi alkaa jo mallastuksen aikana. Mäskäyksessä proteiinien hydrolyysi jatkuu proteinaasin ja karboksipeptidaasin vaikutuksesta. Mäskäyksessä voidaan pitää ns. proteolyysitauko proteinaasin optimilämpötilassa 45–55 °C:ssa. Noin 80 % aminohapoista kuitenkin pilkkoutuu karboksipeptidaasin toimesta jopa 70 °C:ssa, jolloin vapaita aminohappoja muodostuu lähes koko mäskäyksen ajan [Enari & Mäkinen 2015: 86–87].

Mallasohran pH on normaalisti noin 5,7–5,8. Happolisäyksillä pH:ta voidaan laskea 5,2–5,3:een, mikä on tärkkelyksen hydrolyysin kannalta optimaalisempi pH. Mäskin

pH:ta säätämällä voidaan saavuttaa mm. lyhyempi sokeroitumisaika, korkeampi käymisaste, parempi uutesaanto ja enemmän vapaata aminotyyppiä. [Enari & Mäkinen 2015: 88.]

Mäskäys on valmis, kun on saavutettu haluttu hydrolyysiasaste. Tavallinen vaiheinfuusiomäskäys tai yksivaiheinfuusiomäskäys kestää 60–120 minuuttia. Pidempi mäskäys ei tuota merkittävästi parempaa saantoa, joten nopeamman käymisprosessin saavuttamiseksi 3–4 tunnin mäskäys yksivaihe- tai infuusiomäskäyksessä on turhaa [Briggs ym. 2004: 104–109]. Hydrolysoimaton tärkkelys voidaan havaita vierteestä joditestillä, jolloin mäskäystä pitää tarvittaessa jatkaa. [Enari & Mäkinen 2015: 89–91.]

Kuvassa 3 on esitetty vaiheinfuusiomäskäyksen lämpötila-aika askeleet. Ensimmäisessä vaiheessa mäskin lämpötila nostetaan 40 °C:sta 55 °C:seen 15 minuutin aikana. Lämpötilan noston aikana endo- $\beta$ -glukanaasi pilkkoo  $\beta$ -glukaaneja. Mäskiä pidetään 55 °C:ssa 30 minuuttia ns. proteolyysitauon ajan, jolloin maltaan proteinaasi ja karboksiptinaasi pilkkovat ohran proteiineja aminohapoiksi ja peptideiksi. Seuraavaksi on sokeroitumistauko  $\beta$ -amylaasin optimilämpötilassa, jolloin muodostuu käymiskelpoisia sokereita. Lopuksi lämpötila nostetaan  $\alpha$ -amylaasin optimilämpötilaan jolloin  $\beta$ -amylaasi inaktivoituu ja syntyy käymiskelvottomia sokereita, jotka antavat olueen runkoa. [Enari & Mäkinen 2015: 89–91]



Kuva 3. Infuusiomäskäyksen lämpötila-askeleet. [Enari & Mäkinen 2015: 91.]

Joskus mäskäyksen lopuksi maskin lämpötila nostetaan 80 °C:seen entsyymien toiminnan pysäyttämiseksi, tätä kutsutaan ulosmäskäykseksi. Entsyymien toiminnan loppuessa oluen rungon sokeri-profiili ei enää muutu siivilöinnin aikana ja vierteen viskositeetti laskee lämpötilan noustessa. Ulosmäskäys ei ole välttämätöntä, mutta kohdatesa suodatusongelmia, kuten tukkeutunut maskipeti, on se suositeltava toimenpide. [Palmer 2006: 180].

#### 2.2.4 Siivilöinti

Mäskäyksen loputtua sokeripitoinen vierre erotetaan kiinto-aineista. Vierteen erotukseen kuluu aikaa menetelmästä riippuen puolestatoista tunnista jopa 18 tuntiin [Briggs ym. 2004: 119]. Pienpanimoissa yleisimmin käytössä oleva menetelmä on siiviläamme, sitä vastoin isoissa teollisuuspanimoissa käytetään erilaisia mäskisuodattimia, strain-master-laitetta sekä maskinsuodatin 2001 –laitetta niiden parempien ominaisuuksien takia [Eblinger & Narzib 2009: 199–200; Enari & Mäkinen 2015: 102–105]. Käytettävästä menetelmästä riippumatta, siivilöinnin tärkeimmät tavoitteet ovat käymiskelpoisten sokerien maksimaalinen saanto, kirkas vierre ilman suspendoituneita kiintoaineita sekä liuenneen hapen määrän minimointi vierteessä [Hornsey 1999: 38–40]. Maskin siivilöinnissä vaikuttavat parametrit ovat maskipatjan paksuus, maltaan jauhatustaso, maltaan möyhentyneisyys, maskin pH ja lämpötila, patjan sekoituksen määrä ja huuhteluveden ominaisuudet (pH ja lämpötila) [Briggs ym. 2004: 119–121].

Siiviläamme on laakea astia, jonka pohjalla on valepohja tai vaihtoehtoisesti rei'itettyjä putkia vierteen erottamista varten [Eblinger & Narzib 2009: 200]. Ammeen suodattavana kerroksena toimivat ohran jyvien kuoret, jotka muodostavat suodattavan kakun valepohjan päälle. Siivilöinti aloitetaan siirtämällä maski mäskäysastiasta suoraan siiviläammeeseen. Maskin lämpötila pysyy samana kuin se oli mäskäyksen lopussa. Maskin ei anneta jäähtyä, sillä se hidastaa suodatusta. Ensimmäisenä siiviläammeesta tuleva vierre voi olla vielä sameaa, joten sitä kierrätetään maskipatjan läpi takaisin siiviläammeeseen, kunnes vierre kirkastuu. Kirkasta vierrettä aletaan keräämään talteen ja aluksi saadaan talteen ns. etuvierre. Maskipatjaa ei saa päästää kuivumaan ja painumaan kasaan, vaan patjan pintaa pöyhitään ajoittain suodatinvastuksen kasvaessa. Kun etuvierre on kerätty talteen, aloitetaan maskipatjan huuhtelu patjaan jääneen uut-

teen saamiseksi talteen. Mäskäys ja siivilöinti voidaan tehdä myös samassa astiassa, jolloin mäskäyksen loputtua siivilöinti voidaan aloittaa heti. [Enari & Mäkinen 2015: 102–103.]

Mäskipatjan huuhtelu tapahtuu levittämällä vettä tasaisesti patjan pinnalle pintaa kuitenkaan rikkomatta. Huuhteluveden lämpötila on normaalisti 75–78 °C:ta. Kuumemman huuhteluveden käyttö ei ole suositeltavaa, sillä sen on todettu huuhtovan maltaasta ei-haluttuja aineita, kuten hajoamatonta tärkkelystä, hemiselluloosaa ja jyvän kuoren fenoliyhdisteitä. Huuhtelun edetessä talteen kerätyn vierteen uutepitoisuus ja laatu alkaa laskea. Huuhtelu lopetetaan ja patjan annetaan valua kuivaksi kun vierteen uutepitoisuus laskee tasolle 1,5–2,5 %. [Briggs ym. 2004: 119; Hornsey 1999: 40–41]

### 2.2.5 Vierteen keitto

Siivilöinnistä kerätty makea vierre keitetään ja samalla siihen lisätään oluen mausteet, useimmiten humalaa. Keittämisessä tapahtuu useita asioita: ensinnäkin vierre sterilisoi-tuu, mäskäyksessä käytetyt entsyymit denaturoituvat ja saostuvat muiden valkuaisai-neiden kanssa, humalan katkeroaineet liukenevat ja isomerisoituvat, ei-haluttuja aromi-ja flavoriyhdisteitä haihtuu pois ja vierre konsentroituu. Keitto tapahtuu erillisessä katti-lassa ja lämmitysmenetelmät vaihtelevat panimosta riippuen. [Enari & Mäkinen 2015: 91–93, 106; Huttunen 2010: 207] Keiton aikana tapahtuu myös sokerien ja aminohap-pojen välillä Maillard-reaktioita, joista syntyy väriaineita sekä flavori- ja makuyhdisteitä. [Enari & Mäkinen 2015: 93.]

Normaali keittoaika on 60–120 minuuttia ja haihtuminen keitossa 5–15 %. Haihtumisen avulla keiton aikana päästään eroon useista ei-toivotuista aromiaineista ja oluttyylistä riippuen voidaan säädellä dimetyylisulfidin (DMS) määrää oluessa [Eblinger & Narzib 2009: 200–201; Enari & Mäkinen 2015: 92; Lewis & Bamforth 2006: 103–104]. Vierteen siivilöinnissä vierre saattaa laimentua mäskipatjan huuhtelun seurauksen. Vettä haih-duttamalla vierteen sokeripitoisuus voidaan konsentroida takaisin haluttuun vahvuuteen [Enari & Mäkinen 2015: 92].

Humala lisätään perinteisesti keiton aikana, koska humalan katkeroaineiden liukenemi-nen ja isomeroituminen iso- $\alpha$ -hapoiksi vaatii kuumuutta. Mitä kauemmin ja kovemmallalla lämmöllä (painekeitto) vierrettä keitetään, sitä parempi on  $\alpha$ -happojen saanto [Enari &

Mäkinen 2015: 84]. Humalan aromaattiset yhdisteet haihtuvat keitossa, joten oluttyylis-  
tä riippuen humalaa lisätään myös keiton lopussa tai selkeytyksen aikana. Eri aikoina  
lisättyjä humalia kutsutaankin käyttötarkoituksensa mukaan katkero-, flavori- ja aromi-  
humalaksi [Eblinger & Narzib 2009: 201].

Vierteessä on paljon maltaista peräisin olevia proteiineja sekä humalan polyfenoleja.  
Päätyessään valmiiseen olueen, ne aiheuttavat sameutta. Keittämällä vierrettä voimak-  
kaasti, proteiinit denaturoituvat ja koaguloituvat polyfenolien kanssa muodostaen sak-  
kaa, rupaa [Eblinger & Narzib 2009: 200–201; Enari & Mäkinen 2015: 93].

## 2.2.6 Selkeytys ja jäähdytys

Keiton jälkeen vierteen tilavuus ja sokeripitoisuus mitataan. Tulosten perusteella vier-  
rettä voidaan laimentaa vedellä, konsentroida jatkokeitolla tai siirtyä prosessissa  
eteenpäin. Ennen vierteen jäähdytystä käymistankkiin siitä on erotettava saostunut  
kiintoaines, rupa, sekä mahdolliset humalakävyt. Humalapelletit erottuvat ruvan muka-  
na. Humalakävyt voidaan erottaa käyttämällä humalasiivilää tai pumppaamalla vierre  
hopback-astian läpi. Rupa sisältää 40–70 % proteiinia, 7–15 % humalan katkeroaineita,  
20–30-% muita orgaanisia yhdisteitä kuten polyfenoleja ja mineraaleja. [Eblinger &  
Narzib 2009: 201–202]

Rupa erotetaan vierteestä käyttämällä jäähdytyslaivaa, saostussäiliötä tai yleisimmin  
vierresyklonia [Enari & Mäkinen 2015: 93, 109]. Jäähdytyslaiva on hitaan jäähtymisen  
ja avoimuutensa takia altis mikrobiologisille kontaminaatioille. Vierresykloni on tasapoh-  
jainen astia, jonne vierre johdetaan tangentiaalisesti. Vierresykloniin syntyy tasainen,  
pyörremäinen liike, jolloin rupa sedimentoituu astian keskelle muodostaen kakun. Kir-  
kas vierre kerätään talteen astian reunoilta ja jäähdytetään. [Eblinger & Narzib 2009:  
202; Enari & Mäkinen 2015: 109.]

Ruvan erottamisen jälkeen vierre jäähdytetään 6–20 °C:seen riippuen siitä, valmiste-  
taanko pohja- vai pintahiivaolutta [Enari & Mäkinen 2015: 110]. Ennen vanhaan vierret-  
tä jäähdytettiin jäähdytyslaivalla tai laitteella, jossa vierre valui kaltevia metallilevyjä  
pitkin käymistankkiin ja levyjen sisällä kiersi jokivesi. Näissä laitteissa kontaminaatoris-  
ki oli suuri ja siksi ne on korvattu levylämmönvaihtimella. [Hornsey 1999: 95–96]

Vierteen jäähtyessä syntyy pieniä määriä kylmärupaa, 5–6 g/hl [Enari & Mäkinen 2015: 110; Hornsey 1999: 96–97]. Kylmäruvan poistaminen ei ole välttämätöntä, koska sillä on todettu olevan mahdollisesti edullisia vaikutuksia pintahiiva-käymisissä. Kylmärupa voidaan poistaa sedimentaatiolla, separoimalla, piimaasuodatuksella tai jäähdyttämällä vierre säiliöön, jonka pohjalta puhalletaan ilmakuplia. Ilmakuplat nostavat kylmärupapartikkelit säiliön pinnalle, josta ne voidaan kuoria pois. [Hornsey 1999: 97–98]

Hiiva tarvitsee happea käymisen alkuvaiheessa. Jos vierteeseen ei ole liuennut happea jäähdytysprosessin aikana, sitä on ilmastettava erikseen. Ilmastus voidaan tehdä injektoidulla paineilmaa tai happea suoraan jäähdytettyyn vierteeseen tai käymistankkiin jäähdytyksen loputtua. Kyllästämällä vierre (12 % °P) ilmalla, siihen liukenee 5 °C lämpötilassa hiivan tarvitsema happimäärä (7–8 mg/l). Jäähdytettyä vierrettä ilmastettaessa on huolehdittava ilman steriilyydestä esimerkiksi steriilisuodattimella. Ilman steriilyydestä ei tarvitse huolehtia, jos ilma injektoidaan kuumaan vierteeseen. Kuumaa vierrettä ei kuitenkaan ilmasteta, koska happi liukenee kuumaan nesteeseen huonosti, ja aiheuttaa lisäksi hapettumisreaktioita, jotka tummentavat vierteen väriä ja huonontavat oluen flavoria. [Eblinger & Narzib 2009: 203; Enari & Mäkinen 2015: 110; Hornsey 1999: 98]

#### 2.2.7 Hiivaus ja käyminen

Sokeripitoinen vierre muuttuu olueksi hiivan fermentoinnin johdosta. Hiivan metaboliatuotteina vierteeseen syntyy etanolia, hiilidioksidia ja muita käymistuotteita, jotka yhdessä vaikuttavat merkittävästi oluen lopulliseen flavoriin. Lisäksi vierteen pH laskee noin 4,3:een, mikä suojaa olutta kontaminaatioilta. [Eblinger & Narzib 2009: 204; Lewis & Bamforth 2006: 114]

Oluen käyminen jaetaan kahteen osaan; pää- ja jälkikäymiseen. Pääkäyminen alkaa, kun jäähdytettyyn ja ilmastettuun vierteeseen lisätään hiivaa. Lisättävien hiivasolujen määrä riippuu valmistettavan oluen vahvuudesta, tyylistä, käymisolosuhteista ja hiivakannasta. Liian suurella tai vähäisellä hiivauksella on huonontava vaikutus lopputulokseen; hiivan määrä vaikuttaa aina käymisasteesta aromi- ja flavoriprofiiliin sekä oluen kirkkauteen. Tämän takia pyritään tiettyyn oluttyyppiin lisäämään aina sama määrä hiivaa tasaisten fermentointien saavuttamiseksi. Hiivasolujen määrän arvioiminen on käytännössä vaikeaa, perinteisesti on käytetty lisättävän hiivalietteen tilavuuden suh-

detta fermentoitavan vierteen tilavuuteen; esimerkiksi 12 % vierteelle (% -lukema kuvaa vierteen kuiva-ainepitoisuutta painoprosentteina) 0,5 litraa paksua hiivalietettä 100 vierrelitraa kohden. Esimerkin kaltaisella hiivauksella pitäisi saavuttaa solupitoisuus 15 milj. solua/ml, mikä on kylmässä käyvälle Lager-oluelle sopiva määrä. [Enari & Mäkinen 2015: 143–145; Hornsey 1999: 115; Wyeast 2015]

Vierre voidaan hiivata erilaisilla menetelmillä; hiiva voidaan lisätä vierteen joukkoon jäähdtyksen aikana linjassa tai jäähdtyksen jälkeen tankissa. Hiiva voidaan myös lisätä käymistankin pohjalle ennen jäähdtytystä. Tärkeää on, että hiiva ja vierre sekoituvat hyvin. Hiivan lisäys suoraan jäähdtysinjaan heti vierteen jäähdtyksen jälkeen takaa käymisen nopean alkamisen, mikä suojaa vierrettä kontaminaatioilta. [Enari & Mäkinen 2015: 143–144.]

Taulukossa 1 on kaupallisen hiivavalmistajan suosituksia eri vahvuisten Ale- ja Lager-oluiden hiivausmäärille. Taulukosta nähdään, että mitä vahvempi vierre, sitä enemmän tarvitaan hiivasoluja. Myös lämpötilalla on merkitystä; etenkin kylmässä käyvillä Lager-oluilla hiivausmäärä on suurempi kuin lämpimässä käyvillä Ale-tyyppisillä oluilla. [Wyeast 2015]

Taulukko 1. Kaupallisen hiivanvalmistajan suositukset pinta- ja pohjahiivojen hiivausmäärille vierteen vahvuuden mukaan. [Wyeast 2015]

Tyyli	Vahvuus P°	Käymislämpötila °C	Hiivausmäärä miljoonaa solua/ml
Ale	15	>18	6
Ale	15–19	>18	12
Ale	19	>18	>18
Lager	15	<15	12
Lager	15–19	<15	18
Lager	19	<15	>24

Hiivauksen jälkeen hiivalla on ns. *lag*-vaihe (lepovaihe) jonka aikana hiiva totuttautuu olosuhteisiin. Lepovaiheen kesto riippuu hiivan iästä, kunnosta ja koosta ja se kestää normaalisti useita tunteja ja ensimmäiset näkyvät merkit käymisestä ilmaantuvat 12–24

tunnin kuluttua hiivauksesta. Käymisen alussa hiivasolujen määrä kasvaa vierteessä olevan hapen ansiosta. Hapen avulla hiiva syntetisoi steroleita ja tyydyttymättömiä rasvahappoja, joita tarvitaan solumembraanin rakennusaineena. Hapen loputtua hiiva alkaa fermentoimaan vierteen sokereita ja aineenvaihdunnan lopputuotteena vierteeseen syntyy etanolia ja hiilidioksidia. Ensimmäiset näkyvät merkit käymisestä ovat vierteen pintaan nousevat kuplat ja vaahdon muodostus. Käymisen alkaminen voidaan todeta myös lämpötilan noususta ja pH:n laskusta, jotka johtuvat hiivan vilkastuneesta aineenvaihdunnasta. 24–48 tunnin kuluttua hiivauksesta hiivan aineenvaihdunta kiihtyy entisestään; vierteen pintaan nousee lisää vaahtoa ja pH:n laskun johdosta humalan hartsien liukoisuus alenee jolloin niitä saostuu vaahtoon. Vaahto muuttuu vierteestä erkanevien ainesosien takia kirjavaksi. Kun käymisen alkamisesta on kulunut noin 3 vuorokautta, alkaa käymisen vilkkain vaihe. Hiilidioksidin muodostus on korkeimmillaan ja vaahto voi muodostaa jopa 30 cm korkuisia harjanteita. Vierteen uutepitoisuus laskee jopa 2 % vuorokaudessa ja pH laskee 4,4:ään. Vilkaista käymistä kestää kunnes hiivan toiminta alkaa hiipumaan uutepitoisuuden laskiessa sekä hiilidioksidin ja alkoholin inhiboivan vaikutuksen johdosta. Hiilidioksidin muodostuksen vähentyessä käymisvaahto laskeutuu peitteeksi nuoroluen päälle. Nuoroluen pH ei enää laske eikä lämpötila nouse. Hiivan sedimentoitumista voidaan nopeuttaa jäähdytyksellä. Käymisen vilkkain vaihe kestää oluesta riippuen 3–5 vrk ja viimeinen vaihe jäähdytyksen ja sedimentoitumisen kanssa 3–4 vrk. Pääkäyminen on ohi noin 6–10 vuorokaudessa. Nuoroluen alkoholipitoisuus on vähän alhaisempi kuin valmiin tuotteen ja näennäinen uutepitoisuus on n. 3 % tai hieman enemmän. [Enari & Mäkinen 2015: 106, 148–149.]

Pääkäymisen jälkeen olut on maultaan vielä raakaa, kitkerää ja epätasapainoista. Olutta onkin kypsytettävä jälkikäymisessä ja sen tarkoituksena on kyllästää olut hiilidioksidilla, kypsyttää oluen makua ja kirkastaa olut saostamalla sameuspartikkeleita. [Enari & Mäkinen 2015: 154]

### 2.2.8 Kypsytytys

Pääkäymisen jälkeen olut kypsytetään ennen astiointia/pullotusta. Kypsyttäminen, toisin sanoen jälkikäyminen, voi tapahtua samassa tankissa kuin pääkäyminen tai erillisessä kypsytystankissa. Oluen jälkikäyminen ja kypsytytys voi tapahtua myös pullossa. Näin kypsytettyjä oluita kutsutaan pullokäyneeksi [Markkula 2014]. Olut-tyylistä riippu-



en jälkikäyminen voi olla suhteellisen lyhyt (ale) tai koko valmistusprosessin pitkäkestoisin vaihe (lager). [Hornsey 1999: 139]

Oluen kypsyttämällä halutaan vaikuttaa seuraaviin asioihin:

- oluen flavorin kypsymiseen
- kirkkauteen
- stabiilisuuteen
- hiilidioksidi-pitoisuuteen
- liuenneen hapen määrään.

Jälkikäymisessä oluesta poistuu pääkäymisessä syntyneitä ei-haluttuja hiivan sivutuotteita, kuten asetaldehydiä, rikkiyhdisteitä ja diasetyyliä. Nuoroluella on tyypillistä asetaldehydien aiheuttamat ruohomaiset flavorit ja diasetyyli aiheuttaa jo alhaisissa pitoisuuksissa olueen epämiellyttävän voimaisen flavorin. Jälkikäymisessä asetaldehydi pelkistyy etanoliksi ja diasetyyli sekä rikkiyhdisteet poistuvat hiivan aineenvaihdunnan tuloksena. Hiivan suorittama ”puhdistus” on hidas prosessi ja hiivan on oltava tervettä ja hyväkuntoista. Joissain tapauksissa diasetyylin ja sen prekursorin  $\alpha$ -asetomaitohapon pitoisuutta voidaan pitää merkinä valmiista kypsytyksestä. Diasetyylin ja sen prekursorin pitoisuuden ollessa alle makukynnyksen,  $<0,05$  mg/l, voidaan oluen flavorin olettaa olevan moitteeton ja tarpeeksi kypsä. [Enari & Mäkinen 2015: 154–156; Hornsey 1999: 139]

Nuoroluessa voi pääkäymisen jälkeen olla jopa 10 miljoonaa hiivasolua millilitrassa, siksi onkin tärkeää laskeuttaa hiiva pois kypsytyksen aikana. Hiiva flokkuloituu ja vajoaa tankin pohjalle tehokkaasti lämpötilan laskiessa. Hiivan flokkuloimista ei kuitenkaan tule suorittaa liian aikaisin, sillä aktiivista hiivaa tarvitaan edellä mainittujen haitallisten komponenttien poistamiseen. Kun olut jäähdytetään hiivan poistamiseksi, poistuu samalla myös muita aineita, joilla on vaikutusta oluen stabiilisuuteen. Kypsyvässä oluessa esiintyy ns. kylmäsameutta, jota esiintyy oluen ollessa lähellä  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ :ta, oluen lämmetessä kylmäsameus häviää. Kylmäsameuden lisäksi esiintyy pysyvää sameutta, joka johtuu suurimolekyylisten yhdisteiden saostumisesta. Sameutta aiheuttavien proteiinien ja polyfenolien yhdisteiden liukoisuus huononee mitä kylmempää olut on. Sameuspartikkeleiden vajoamista voidaan nopeuttaa erilaisilla liukenemattomilla lisäaineilla, jotka

sitovat itseensä sameuspartikkeleiden prekursoreita. On yleisesti todettu, että laadukkailla raaka-aineilla ja hyvällä valmistuskäytännöllä voidaan yleensä päästä eroon sameusongelmista. [Enari & Mäkinen 2015: 167; Hornsey 1999: 139–140]

Olueen halutaan tyylistä ja pakkausmuodosta riippuen eri hiilidioksidipitoisuuksia. Henryn lain mukaan vakioämpötilassa olevaan nesteeseen liukenevan kaasun määrä on verrannollinen sen osapaineeseen nesteen päällä. Hiilidioksidin liukenemista säädelään oluen lämpötilalla ja tankissa vallitsevalla ylipaineella. Hiilidioksidi liukenee tehokkaammin etanoliin kuin veteen, joten vahvoihin oluihin liukenee hiilidioksidia nopeammin. [Enari & Mäkinen 2015: 154.]

Kun oluen maku on kypsynyt, flavori kohdillaan ja hiilidioksidipitoisuus oikea, olut on valmis markkinoitavaksi ja myytäväksi. Olutta pakataan ravintola-astioihin, pulloihin, tölkkeihin tai kuljetetaan säiliöautolla anniskeluliikeisiin.

### **3 Stadin Panimo**

Helsingissä 1990-luvun lopulla perustettu Stadin Panimo on yli kymmenen toimintavuotensa aikana tuottanut useita palkintoja voittaneita oluita. Panimon tuotteet ovat valtavirrasta poikkeavia, suodattamattomia, pastöroimattomia, hopback-aromihumaloituja ja pullokäyneitä erikoisoluita. 2000-luvun alussa panimo valmisti vain pintahiivaoluita, mutta vuodesta 2009 alkaen valikoimiin on kuulunut myös pohjahiivaoluita. [Stadin Panimo 2015.]

Omistajan lisäksi panimo työllistää vakituisesti 4 henkilöä sekä työharjoittelijoita. Vuosina 2010–2013 panimon vuosituotanto oli 40 000–50 000 litraa, mutta vuonna 2014 se oli noussut jo 90 000 litraan. Oluiden lisäksi panimon valikoimaan kuuluu aito, kuiva omenasiideri. [Stadin Panimo 2015.]

#### **3.1 Valmistusprosessi**

Stadin panimon maltaat tulevat panimolle pääosin rouhittuna 20 kg säkeissä. Joitain erikoismaltaita ei ole saatavana rouhittuna, joten ne rouhitaan panimolla käsin valssimyllyllä. Maltat mäskätään kahdessa 500 litran höyryvaipallisessa mäskäys-

sammiossa. Höyry tuotetaan kahdella rinnan kytketyllä höyrykehittimellä. Sammioiden lämmitysmahdollisuus mahdollistaa erilaisten lämpötila-askeleiden käyttämisen mäs-käyksessä ja ulosmäskäyksen. Sammioiden pohjalla on rihlattu teräsputki, jonka kautta vierre kerätään talteen ja pumpataan keittokattilaan. [Gren 2015.]

Keittokattilan kokonaistilavuus on 1000 litraa, mutta käytännössä vierrettä kerätään talteen korkeintaan 930 litraa. Keittokattilan lämmitys tapahtuu höyryvaipan ja höyryn avulla kuten mäskäyksessäkin. Keittokattilassa on sekoitin mahdollisia sokerilisäyksiä varten. Keiton jälkeen mitataan kantavierrepitoisuus ja vierre kerätään keittokattilan pohjasta pumpun avulla ja johdetaan hopback-astiaan aromihumalointia varten. Hopback astia on tilavuudeltaan 100 litran kokoinen lävikkö, jonka sisälle ladataan 1–2 kg humalakäpyjä. Kuuma vierre pumpataan lävikön sisälle, jolloin humalakävyt muodostavat lävikön sisäpinnalle suodattavan kerroksen. Näin hopback-astia toimii samalla suodattimena, joka kerää kattilasta mahdollisesti irtoavan ruvan. Stadin Panimon prosessissa ei ole vierresyklonia ruvan ja humalan kiintoaineiden erottamista varten. Kiintoaines ja rupa vajoavat keittokattilan pohjalle ja pohjaventtiilin auetessa imu puhkaisee reiän pohjalle muodostuneeseen kakkuun. Talteen kerätty vierre on suurimmilta osin vapaata kuiva-aineista ja ruvasta, mutta hopback-astian avulla viimeisetkin kiintoainepartikkelit suodattuvat pois vierteen joukosta. [Gren 2015.]

Hopback-astian jälkeen on kalvopumppu, jolla vierre pumpataan jäähdytykseen. Olut jäähdytetään vastavirtalevyllämmönvaihtimella haluttuun lämpötilaan ja pumpataan 2000 litran kartiopohjaiseen käymistankkiin. Käymistankissa on jäähdytysvaippa, mikä mahdollistaa pintahiivaoluiden lisäksi Lager-oluiden valmistuksen. [Gren 2015.]

Panimolla on käytetty enimmäkseen kuivahiivaa sen vaivattomuuden takia. Kuivahiivaa käytettäessä hiivat on annosteltu tankin pohjalle miesluukun kautta ennen sen täyttämistä. Jäähdytetyn vierteen siirtyessä tankkiin hiiva sekoittuu samalla tehokkaasti. Nestemäinen hiiva on aikaisemmin siirretty ravintola-astiasta hiilidioksidipaineella käymistankkiin. Eri vaihtoehtoja vierteen hiivaukselle nestemäisellä hiivalla on pohdittu seuraavassa luvussa. [Gren 2015.]

Panimon käymistankit ovat 2 kertaa suuremmat kuin suurin mahdollinen keitto. Sen sijaan, että keitetäisiin kaksi vierrettä peräkkäin saman vuorokauden aikana, panimolla käytetään menetelmää nimeltä tuplaaminen. Tuplaamisessa ensimmäinen vierre hiiva-

taan ja se saa käydä muutaman päivän, minkä jälkeen sen päälle lisätään toinen erä samanlaista vierrettä. Ensimmäisen käymisen aikana hiivasolujen lukumäärä on kasvanut niin suureksi, että tankissa on tarpeeksi soluja myös lisätyn jäähdytetyn vierteen käyttämiseen. [Gren 2015.]

Käymistä seurataan uutepitoisuuden putoamisen avulla. Kun haluttu käymisaste on saavutettu, tankki jäähdytetään, jolloin hiiva ja muut kiintoaineet laskeutuvat käymistankin pohjalle. Kartiomaisen tankin pohjalta juoksutetaan kiintoaine pois ja nuorolut pumpataan 1000 litran vaakatankkeihin kypsyttämään. Vaakatankeissa olut paineistetaan ja oluen kirkastuminen jatkuu. Oluen kypsyttämistä seurataan aistinvaraisesti ja kun olut on valmista, se pakataan 0,33 l lasipulloihin tai 30 l ravintola-astioihin. [Gren 2015.]

## 4 Hiivan käsittely ja laadunvalvonta pienpanimossa

Pienpanimolla on erilaisia vaihtoehtoja hiivakulttuurien käyttöönottoon, vierteen hiivaukseen, hiivan talteenottoon, säilytykseen, kierrätykseen ja laadunvalvontaan. Tässä kappaleessa pohditaan kirjallisuuslähteiden pohjalta millä tavalla, millaisilla välineillä ja missä muodossa hiivaa voidaan pienpanimossa käsitellä ja miten sen laatua voidaan seurata.

### 4.1 Hiivan alkuperä

Hiivakulttuurien ylläpitoon, säilytykseen ja käyttöönottoon tarkoitettujen toimintojen laajuus ja tarkkuus riippuu paljolti panimon koosta. Suurilla panimoilla on valmiudet ylläpitää omia puhdasviljelmiä ja propagoida, eli kasvattaa, hiiva yhdestä solusta panoshiivaksi asti, kun pienpanimon koko prosessi voi nojautua kolmannen osapuolen varaan, jolta hiivaa hankitaan. Hiivakulttuurien hallitsemisen on oltava laadukas ja hallittu prosessi, missä hiivakulttuurin identiteetti ja puhtaus säilyy panimolle asti. [Briggs ym. 2004: 484]

Pienpanimolla on useita vaihtoehtoja hiivan hankkimiseksi. Joskus uusittava hiivakanta voidaan ostaa kaupalliselta valmistajalta tai toiselta panimolta, mutta jos panimo valmistaa spontaanisti fermentoivia oluita, kuten belgialaista Lambic-olutta, hiiva on peräisin panimon ympäristöstä. Jos panimolla on resurssit hiivan puhdasviljelyyn ja kasvatukseen, se voi toimia omavaraisesti hiivan osalta sen jälkeen, kun alkuperäinen hiiva on saatu hankittua. Panimon omavaraisuus riippuu paljon siitä, kuinka paljon resursseja hiivakantojen puhtauteen, talteenottoon sekä säilytykseen että kasvatukseen se voi käyttää. Jos panimolla ei ole minkäänlaista kasvatuslaitteistoa hiivaa varten, sen on hankittava panoshiivaa riittävän suuri määrä, jotta ensimmäinen vierre saadaan hiivatua. Tämän jälkeen voidaan käyttää käymisessä kasvanutta hiivaa uudelleen, mutta tätä ei voida jatkaa kovin pitkään, vaan jossain vaiheessa panimon on jälleen ostettava uutta hiivaa. Panoshiivan hankintakustannuksissa voidaan säästää jos panimo pystyy kasvattamaan hiivaa itse. Panimo voisi esimerkiksi ostaa kymmenesosan tarvitsemaan hiivamäärästä ja kasvattaa hiivan itse loppuun. [Markkula 2014.]

#### 4.1.1 Kaupallinen toimittaja

Markkinoilla on useita kaupallisia panimohiivoja tuottavia yrityksiä, joista mainittakoon Lallemend (Danstar), Fermentis (Safale, saflager ja safbrew), WhiteLabs ja Wyeast [Source of Brewer's Yeast 2015]. Lallemend ja Fermentis myyvät kuivahiivaa 16 gramman pakkauksista aina 10 kg säkkeihin asti. Whitelabs ja Wyeast toimittavat nestemäistä tuorehiivaa, joka on sellaisenaan käyttövalmista. Tuorehiivaa on saatavilla 35–125 ml pakkauksista yhden litran hiivaymppeihin asti tai sopimuksen mukaan. [Fermentis 2015; Lallemend 2015; Whitelabs 2015; Wyeast 2015.]

Kun panimo tilaa hiivansa kaupalliselta toimittajalta, sen on otettava huomioon toimitusajat ja hiivojen säilyvyys panimolla. Kuivahiiva kulkee normaalina postipaketina ja säilyy panimolla hyvin. Panimolla voikin olla kuivahiivaa runsaasti varastossa odottamassa käyttöä. Tuorehiiva on elävää, joten hiivan matka valmistajalta panimon vierteeseen olisi pidettävä mahdollisimman lyhyenä. Tuorehiiva on myös alttiimpi lämpötilan vaihteluille. Tuorehiiva kuljetetaan lämpöeristetyssä paketissa jääpussien kanssa. Näin hiivan lämpötila pysyy riittävän alhaisena kuljetuksen aikana. [Markkula 2014.]

#### 4.1.2 Toiselta panimolta hankittava hiiva

Panimo voi saada hiivansa myös toiselta panimolta, jos panimot kuuluvat esimerkiksi samaan konserniin tai tekevät muuten yhteistyötä. Tällainen tilanne kuitenkin vaatii, että yhdellä hiivaa jakavalla panimolla on mahdollisuudet hiivakantojen ylläpitoon (tallenteenotto, säilytys, laadun ja puhtauden varmistus sekä propagointi) ja toimitukseen muille panimoille. Tilanteessa, missä yhteistyötä tekevät panimot toimittavat hiivaa toisilleen, kannan ylläpitäjällä on suurempi vastuu sen puhtaudesta ja laadusta kuin vastaanottavalla panimolla, jonka vastuulle jää huolehtia vastaanotetun hiivan saattamisesta elinkykyisenä vierteeseen. Käytännöt voivat vaihdella suuresti eri panimoiden välillä. [Briggs ym. 2004: 484.]

#### 4.1.3 Omat hiivakannat

Panimon käyttäessä omia hiivakantoja, niiden säilytys ja puhtaana pitäminen vaatii mittavat toimenpiteet. Tämä onkin yleisempää suurilla panimoilla, joilla on omat laboratoriot puhdasviljelmien säilyttämistä ja propagoimista varten. Pienemmillä panimoilla

hiivan puhdasviljelmien säilytys ja uuden kulttuurin kasvattaminen voidaan ostaa palveluna. Tällaisessa toimintatavassa panimo tilaa ulkopuoliselta toimittajalta oman hiiva-kantansa säännöllisin väliajoin ja kierrättää sekä säilyttää hiivaa panimolla kunnes on aika tilata tuore kanta. [Briggs ym. 2004: 484.]

Edellä kuvattujen toimintavaihtoehtojen pohjalta ilmenee, kuinka panimoilla on lukuisia vaihtoehtoja hiivan hankkimiseksi, käsittelemiseksi ja säilyttämiseksi ja kukin panimo valitsee itselleen sopivimman tavan.

## 4.2 Laitteisto

Vaikka pienpanimoilla on paljon vaatimattomammat resurssit hiivan propagointiin ja sen kontrolloimiseen kuin suurella panimolla, on niillä silti useita toimivia ja edullisia vaihtoehtoja [Sohigian 1998];

- ei propagointia
- propagointi ostetusta/lainatusta/omasta hiivaympistä
- propagointi puhdasviljelmästä.

Tilanteessa, jossa propagointia ei tehdä ollenkaan, panimo ostaa hiivaukseen tarvitse-  
vansa hiivan ulkopuoliselta toimijalta, mikä helpottaa panimon toimintaa, mutta saattaa  
nestehiivan kohdalla osoittautua kalliiksi ja panimo on riippuvainen ulkopuolisesta toi-  
mijasta, myöskään kuivahiivaa käytettäessä ei ole tarvetta propagoinnille. Jos panimo  
päättää suorittaa propagoinnin vain osittain, se ostaa ulkopuoliselta toimijalta esimer-  
kiksi litran konsentroitua hiivalietettä, joka on propagoitu puhdasviljelmästä. Panimo  
kasvattaa tilaamaansa hiivaymppeä 1–3 vaiheessa tarvitsemaansa kokoon asti. Kol-  
mannessa vaihtoehdossa panimolla on oma laboratorio, jossa on mahdollista kasvat-  
taa hiiva puhdasviljelmästä aina hiivattavaan määrään asti. [Sohigian 1998.]

Stadin Panimon toiveiden mukaan kasvatusvaihtoehtoista on valittu kasvatus ostetus-  
ta tai lainatusta hiivakulttuurista, mikä tarkoittaa hiivakulttuurin koosta riippuen kasva-  
tusta panimolla 1–3 vaiheessa.

#### 4.2.1 Hiivan propagoinnin laitevaihtoehdot

##### Muovinen käymisastia

Halvin ja yksinkertaisin vaihtoehto hiivan propagointiin on muovinen kotioluen valmistukseen tarkoitettu käymisastia. Muovisen käymisastian ehdottomia etuja ovat sen halpuus ja helppous kapasiteetin lisäämiseen hankkimalla lisää astioita. Käymisastiaa on helppo liikutella ja se voidaan esimerkiksi kantaa kylmähuoneeseen hiivan propagoinnin jälkeen. Muoviastian huonot ominaisuudet ovat kuitenkin isommat kuin sen edut; muovi naarmuuntuu helposti, astia ei kestä korkeita lämpötiloja (sterilointia), lämpötilan säätö on hankalaa ja hiivan siirto vierteeseen pitää suorittaa miesluukun kautta. Varsinkin hiivaus miesluukun kautta altistaa oluen kontaminaatiolle. [Sohigian 1998.]

##### Cornelius-astia

Cornelius-astia (tunnetaan myös nimellä *soda-keg*) muistuttaa perinteistä 30 l ravintola-astiaa, mutta sen tilavuus on 20 l ja se on kapeampi ja korkeampi. Cornelius-astiasta on mahdollista valmistaa pienin muokkauksin kelvollinen propagointi, hiivaus- ja säilytysastia. Astiassa on pienet pikaliittimin varustetut nesteen ja kaasun tulo- ja menoliittännät. Pikaliittimet tosin kontaminoituvat helposti ja voivat olla liian ohuita paksun hiivalietteen siirtämiseen. Liittämällä astian kanteen paksumpi linja nesteen siirtämiseen, sen käyttöominaisuudet paranevat. Pikaliittimen avulla astiaan voidaan pumpata ilmaa propagoinnin aikana sekä painaa hiivaliete ulos hiilidioksidilla. Hiiva voidaan siirtää astiasta suoraan jäähdytyslinjaan, mikä pienentää kontaminaation riskiä huomattavasti. Lisäksi siirrettävän hiivalietteen määrä voidaan mitata helposti punnitsemalla astiaa siirron ajan. Näin voidaan saavuttaa tarkempi ja toistettavampi hiivausmäärä. Vaikka astian lämpötilaa on vaikea säätää, se on kuitenkin alumiinirungon paremman lämmönjohtavuuden takia helpompaa kuin muoviastian. Jos panimon keittokoko on suuri, Cornelius-astia voi olla liian pieni. Tällöin voidaan hankkia useampia astioita, mutta tämä nostaa kustannuksia ja kontaminaatoriskiä, kun puhdistettavien osien määrä kasvaa. [Sohigian 1998.]

##### Ravintola-astia

Alumiininen 50 litran ravintola-astia (kegi) sopii kokonsa puolesta Cornelius-astiaa paremmin pienpanimon propagointitarkoituksiin. Toisin kuin Cornelius-astia, ravintola-



astia on valmistettu kokonaan alumiinista ilman muoviosia ja tämä mahdollistaa kasvatustalustan steriloinnin keittämällä kasvatustalustaa astiassa. On tärkeää huomioida, että astian ja sisällön jäähtyessä korvausilman on mentävä steriiliin ilmansuodattimen läpi kontaminaation estämiseksi. Myös ravintola-astiassa lämpötilan kontrolloiminen on hankalaa, mutta metallirakenteisiin astioihin on mahdollista rakentaa jäähdytysvaippa lämpötilan säätämiseksi. [Sohigian 1998.]

### Käymistankin kartio

Sylinteripohjaisen käymistankin käyttäminen hiivan propagoimiseen on yleinen tapa monessa pienpanimossa. Menetelmän suurin etu on siinä, että erillisiin propagointiastioihin ei tarvitse investoida ja hiivan siirtoja tapahtuu mahdollisimman vähän. Mitä vähemmän hiivaa tarvitsee siirtää, sitä vähemmän se altistuu kontaminaatioille ja hapelle. Menetelmän käyttäminen vaatii kuitenkin vapaan käymistankin ja kapasiteetin ollessa lähellä ylärajaa, tämä on harvoin mahdollista. [Sohigian 1998.]

Kartiosta kartioon menetelmää voidaan käyttää useilla tavoilla; rajoittavina tekijöinä on vapaiden käymistankkien määrä ja mahdollisuus valmistaa vain pieniä määriä vierrettä. Yksi tapa on valmistaa 1:10 vierrettä keiton koosta käymistankin pohjalle ja hiivata se ilmastuksen kanssa. Kun pääkäyminen on ohi 2–3 vuorokauden kuluttua, tankki täytetään jäähdytettyä vierteellä, jolloin tankissa käynyt hiiva on hyvässä kunnossa ja solumäärä on kasvanut. Ongelmana on kuitenkin tarkan hiivausmäärän määrittäminen ja menetelmä johtaakin usein ali-hiivaukseen, eli liian pieneen hiivamäärään. [Sohigian 1998.]

Jos panimolla on vapaana kaksi käymistankkia, voidaan ensimmäiseen tankkiin keittää vierre josta otetaan talteen 1:10 toisen tankin pohjalle. Ensimmäinen tankki käytetään vanhalla kierrossa olevalla hiivalla ja toisen tankin pohjalle otetaan uusi hiiva käymään. Tämän jälkeen edetään kuten edellisessä menetelmässä. Lopulta kartiosta kartioon siirtäminen voidaan todeta toimivaksi, mutta se antaa hyvin vähän mahdollisuuksia kontrolloida hiivasolujen määrää. [Sohigian 1998.]

### Hiivan kasvatukseen tarkoitettu kasvatustankki

Parhaiten hiivan kasvatusta voidaan kontrolloida tarkoitukseen rakennetulla kasvatus-tankilla. Investointina hiivan kasvatustankki on kuitenkin kallein vaihtoehto. Kasvatus-tankissa on seuraavat ominaisuudet:

- jäähdytys
- ilmastus
- sekoitus
- lämmitys.

Jäähdytysvaippaan voidaan kytkeä myös lämmitys (höyry tai kuuma vesi) jolloin vierre voidaan steriloida tankissa (tankin pitää olla paineenkestävä). Ilmastuksella voidaan myös sekoittaa kasvatusliuosta tankissa, mutta hiivalietteen paksuuntuessa sen teho laskee. Tarkan hiivausmäärän saavuttamiseksi tankissa olisi oltava mahdollisuus seurata hiivalietteen määrää pintamerkkintöjen tai virtausmittarin avulla. [Sohigian 1998.]

#### 4.2.2 Säilytys propagoinnin jälkeen

Hiivan säilytysolosuhteet ovat yhtä tärkeitä kuin hiivan kasvatuksessa vallitsevat olosuhteet. Hiivan säilyttäminen liian pitkään johtaa kasvutekijöiden menetykseen ja säilytyksessä vallitsevat olosuhteet vaikuttavat menetysten suuruuteen. Hiivasolujen degeneraatio lisääntyy lämpimässä ja hiiva on myös pidettävä erossa hapestasta ja bakteereista [Sohigian 1998]. Jos hiiva on laskeutunut tiukaksi kakuksi säilytysastian pohjalle, se kestää korkeampia lämpötiloja ja on vähemmän herkkä hapelle. Vaikka hiiva tuottaa etanolia, on se korkeissa pitoisuuksissa hiivalle toksista. Hiivaa ei siksi tulisi säilyttää nesteessä, jossa on paljon etanolia. Hiilidioksidilla kyllästetyssä nesteessä hiilidioksidi voi muuttua hiivalla myrkylliseksi. [Sohigian 1998]. Talteenotettu hiiva on suositeltavaa lisätä uuteen vierteeseen mahdollisimman nopeasti. Näin hiivalle ei jää aikaa heikentyä ja kuolla, eivätkä pilaajamikrobit saa tilaisuutta kasvaa. Tämä ei kuitenkaan ole aina mahdollista ja hiivaa on varastoitava. [White & Zainasheff 2010: 156–157.]

Hiivakantojen varastointiin on useita käytäntöjä: soluviljely agarilla, kuivaus, kylmäkuivaus, pakastaminen ja syväpakastaminen. Näillä menetelmillä säilötään pikemmin puhtasviljelmiä kuin panimoilla talteenotettua hiivalietettä, mitä voi kertyä suuriakin määriä [Briggs ym. 2004: 484–485]. Yleinen tapa hiivan säilytykseen pienpanimossa

on käyttää modifioitua 20 litran Cornelius-astiaa. Niitä on saatavilla helposti ja edullisesti ja ne voidaan puhdistaa tavallisilla pesuaineilla [White & Zainasheff 2010: 157]. Hiivan säilytys kegissä on hyvin yksinkertaista: propagoinnin päätyttyä laskeutettu hiiva siirretään puhtaaseen kegiin tai jos hiiva on propagoitu kegissä, se voidaan jättää sinne. Tämän jälkeen astia siirretään kylmäkaappiin 0–4 °C:seen. Liiallisen paineen kertymisen estämiseksi astian paineventtiili on jätettävä auki. [White & Zainasheff 2010: 157.]

Jos hiivan propagointitankissa on jäähdytys, hiiva kannattaa säilyttää siinä. Lämpötila voidaan säätää tarpeeksi alas eikä hiiva altistu hapelle eikä kontaminaatioille siirtojen aikana. Hiiva säilyy hyvin fermentoimansa oluen alla. Näin säästytään ylimääräisiltä siirroilta, joissa hiiva altistuu hapelle ja kontaminaatioille. [White & Zainasheff 2010: 157]. Hiivan propagointiprosessin hallitsemisella ja hyvällä tuotannonsuunnittelulla tuore, propagoitu hiiva voidaan ottaa käyttöön heti ilman säilytystä.

#### 4.3 Panimolaboratorio ja hiivan analysointi panimolla

Panimon laboratoriolla on kaksi tehtävää; mikrobiologinen laadunvarmistus ja analyttiset tarkastukset. Mikrobiologinen laadunvarmistus keskittyy hiivaan ja muihin olueen liittyviin mikrobeihin, pääpaino on kuitenkin hiivalla. Analyyseillä seurataan valmistettavan oluen muita ominaisuuksia kuten pH:ta, väriä, alkoholipitoisuutta ja humalan katkeroiden määrää. Panimolaboratorion perustamisen ja laadunvalvontajärjestelmän kehittämisen ei tarvitse olla liian monimutkaista. Yksinkertaisilla laboratorioperiaatteilla on mahdollista parantaa valmistettavien oluiden laatua ilman suurta ajan tai rahan kulutusta. [White & Zainasheff 2010: 174.]

Stadin panimolla on jo olemassa oleva analyysiohjelma. Suunnitellun hiivan propagoinnin ja kierrättämiseen liittyvän laadunvalvonnan takia panimo tarvitsee suunnitelman myös mikrobiologiseen laadunvarmistukseen. Stadin panimon aikomuksena on hiivan 1–3 vaiheinen propagointi kaupallisesta hiivakannasta ja hiivan kierrätys. Tämän takia panimolla ei ole tarvetta ylläpitää hiivakantoja eikä propagointia tarvitse aloittaa puhtasviljelmästä. Tämä vähentää huomattavasti panimolla tarvittavien laboratoriovälineiden määrää. Panimolla helposti suoritettavia testejä ja mittauksia hiivan kunnon seuraamiseen ovat:

- solumäärän määrittäminen
- hiivan elävyys
- hiivan elinkyvyn määrittäminen
- diasetyylitesti
- fermentointikyky-testi
- hiivakannan happivaatimukset
- hiivan happamoituminen – testi.

Kaikki testit eivät ole välttämättömiä, mutta ainakin solumäärä ja hiivan elävyys ovat tarpeellisia testejä tasalaatuisten oluiden valmistuksessa.

#### 4.3.1 Hiivan solumäärä ja elävyys

Perinteinen tapa mitata hiivasolujen määrä suspensiossa on viljellä tunnettu tilavuus näytettä kasvatusalustalle ja laskea kasvaneiden pesäkkeiden lukumäärä inkuboinnin jälkeen. Pesäkkeiden lukumäärästä voidaan laskea elävien solujen lukumäärän näytteenä. Menetelmässä oletetaan, että jokainen pesäke on kasvanut yhdestä solusta. Menetelmä on hidas ja vaatii käyttäjältään mikrobiologisen työskentelyn taitoja [Briggs ym. 2004: 502]. Nopeampi, panimoissa yleisesti käytössä oleva menetelmä on laskea hiivasolut mikroskooppilla laskentakammioista, eli hemosytometristä. Menetelmä on käytännöllinen myös sen takia, että näytteeseen voidaan lisätä erilaisia värjäysaineita joiden avulla voidaan arvioida kuolleiden hiivasolujen osuus. Jos kuolleiden hiivasolujen osuus näytteestä on esimerkiksi 7 %, on näytteen elävyys 93 %. [Briggs ym. 2004: 502; White & Zainasheff 2010: 245].

Mittauksessa käytetään mikroskooppia ja siinä tulisi olla vähintään 400-kertainen suurennos sekä mahdollisuus liikuttaa näytettä x- ja y-akselilla. Näyte asetetaan lasiselle hemosytometrille, johon on kaiverrettu ruudukko. Ruutujen kannat muodostavat lukuisia neliön muotoisia alueita ja yhdessä peitinlasin kanssa ne muodostavat kammioita, joiden avulla solujen laskeminen tapahtuu. Solumäärän ja elävyyden määrittämisessä sopiva laimennos näytettä sekoitetaan yhtä suureen määrään värjäysainetta (esim. metyleenisininen) ja näyte asetetaan laskentakammioon. Metyleenisininen tunkeutuu soluihin sisälle ja värjää solut sinisiksi. Elävät solut pystyvät kuitenkin pelkistämään

värjäysaineen värittömmään muotoon ja ne eivät värjäydy. Värjäytyneiden ja värittömien solujen määrä lasketaan ja kun otetaan huomioon alkuperäisestä näytteestä tehdyt laimennokset, voidaan laskea hiivasolujen määrä suspensiossa ja kuolleiden hiivasolujen prosentuaalinen osuus. [Briggs ym. 2004: 502.]

Elävyyden määrittäminen metyleenisinisellä antaa suurempia arvoja kuin perinteinen kasvatusalustamenetelmä elatusalustalla. Kun näytteen elävyys on suurempi kuin 90 %, erot ovat kohtuullisia. Ero kasvaa näytteen elävyyden laskiessa ja mittaustulos vääristyy entisestään. Briggsin ym. (2004, s. 502) mainitsemissa kokeissa vertailtiin erilaisten värjäysaineiden tarkkuutta perinteiseen kasvatusalustamääritykseen; vertailun tuloksena todettiin, että sitraatti-metyleeni-violetilla saadaan luotettavimmat tulokset. Tästä huolimatta metyleenisininen on laajassa käytössä ja on todettu, että metyleenisinisellä värjääminen tuottaa riittävän hyviä tuloksia, kun näytteen analysoi koulutettu henkilö ja näytteen todellinen elävyys on yli 80 %. [Briggs ym. 2004: 502.]

Hiivasuspension solumäärän ja elävyyden määrittämiseen ja näytteiden laimentamiseen panimolla tarvitaan:

- mikroskooppi
- hemosytometri + peitinlasi
- 1 ml ja 10 ml siirtopipettejä
- hienokärkisiä lasipipettejä
- pumpetti pipetoimiseen
- koeputkia
- koeputkiteline
- käsilaskuri
- ionivaihdettua vettä
- metyleenisinistä.

Ohjeet näytteen käsittelyyn ja mittauksen tekemiseen on esitetty liitteessä 1.

#### 4.3.2 Elinkyky

Hiivan elinkyvyllä (engl. *vitality*) tarkoitetaan hiivan fysiologista tilaa, joka kuvaa suoraan hiivan kykyä hyvään fermentointiin. Vaikka hiivan elävyydeksi mitattaisiin 100 %, hiiva voi olla stressaantunut, nälkiintynyt tai vanhentunut. Pelkän elävyyssmittauksen perusteella oluenpanija tekisi päätöksen käyttää kyseistä hiivaerää. Hyvästä elävyydestä huolimatta tuloksena voisi olla hitaasti alkanut tai vajaaksi jäänyt fermentointi. Edellä kuvaillun tilanteen välttämiseksi on kehitelty muita testejä, joilla pyritään määrittämään hiivan elinkyky. Näiden testien ja elävyyismäärityksen pohjalta voidaan tehdä päätös, otetaanko hiivaerä käyttöön vai ei. [Briggs yms. 2004: 504–505.]

Tärkeimmät hiivan elinkykyä mittaavat testit liittyvät suoraan hiivan kykyyn fermentoida. Laboratoriomittakaavan fermentoinnilla voidaan hyvin ennustaa hiivan elinkyky, mutta tämä on liian aikaa vievää ollakseen käytännöllistä. Hiivan elinkykyä voidaan mitata muilla nopeammilla testeillä, joissa mitataan mm. hiivan hapen tai glukoosin kulutusta, hiilidioksidin tai etanolin muodostusta ja eksotermisyyttä. Lisäksi voidaan testata hiivan kykyä happamoida kasvatusliuos ensin spontaanisti ja sitten sen reagoidessa sokerialiäykseen. Näiden kahden happamuuden muutoksen avulla voidaan tehdä päätelmiä hiivan varastoravinteista ja kyvystä hyödyntää glukoosia. [Briggs yms. 2004: 504–505.]

Osa edellä kuvatuista menetelmistä on pienpanimon kannalta liian kalliita, aikaa vieviä, kiistanalaisia sekä työläitä. Stadin Panimon tarpeisiin ja resursseihin paremmin sopivat testit ovat fermentointitesti ja hiivan hapattamiskykyä seuraava testi. Fermentointitesti vie enemmän aikaa, mutta se voidaan tehdä esimerkiksi talteenotetusta hiivasta muutama päivä ennen hiivan varsinaista käyttöä, jolloin saadaan kuva hiivan elinkyvystä ja tarvittaessa hiivaerä voidaan hylätä tai sitä voidaan yrittää elävöittää. Hapattamiskykytesti on nopeampi ja se voidaan tehdä samana päivänä kuin suunniteltu hiivaus. Testin tuloksien, solumäärän ja elävyyssprosentin avulla voidaan optimoida hiivausmäärä terveän fermentoinnin saavuttamiseksi. [White & Zainasheff 2010: 167, 222.]

Ohjeet fermentointitestin ja hapattamistestin suorittamiseen on esitetty liitteessä 2.

#### 4.3.3 Muita analyysejä

Edellä mainitut testit mittaavat hiivan terveyttä ja lukumäärää. Varmistaakseen myös hiivaerän puhtauden, panimon on tarkistettava hiiva pilaajamikrobien varalta. Vaikka panimon koko tuotantoprosessi olisi hygienialtaan erinomainen, voi hiivaerässä oleva mikrobi pilata koko tuotantoerän. Hiivan tutkiminen kontaminaatioiden varalta tehdään maljaviljelyillä erikoiskasvatusalustoille 3–5 päivää ennen käyttöä. Viljelyissä tutkitaan onko hiivan seassa yleisiä pilaajamikrobeja, joita ovat aerobiset ja anaerobiset bakteerit sekä villihiivat. [White & Zainasheff 2010: 209–210.]

Maljaviljelyiden toteuttaminen panimolla vaatii mahdollisuuden valmistaa, steriloida ja inkuboida kasvatusalustoja. Lisäksi luotettavien tulosten saamiseksi näytteiden siirrostaminen maljoille tulisi tehdä mahdollisimman puhtaissa tiloissa ilmapirtauksilta suojissa. Nämä kriteerit voivat osoittautua liian vaativiksi pienpanimolle. Karkea, yksinkertainen tapa tarkastella hiivaerää kontaminaatioiden varalta, on mikroskopoida näytettä ja etsiä hiivasolujen joukosta poikkeavia soluja. Menetelmällä ei voi havaita hyvin pieniä kontaminaatioita, mutta tällöin ei toisaalta yleensä ole odotettavissa ongelmia käymisessä. Jos mahdollinen kontaminaatio kasvaa liian suureksi, sen voi mahdollisesti nähdä mikroskopoimalla, jolloin hiivaerä voidaan hylätä. Jos halutaan luotettavasti varmistua erän puhtaudesta, panimo voi lähettää näytteen propagoimastaan tai talteen ottamastaan hiivaerästä kaupallisille laboratoriolle tutkittavaksi. [Markkula 2014.]

Jos oluterä kontaminoituu ja käytetty hiiva oli todettu puhtaaksi, on kontaminaation lähde jossain muualla. Yksinkertainen tapa testata prosessin kuumen ja kylmän puolen puhtautta on vierretesti. Vierretestissä kerätään vierteestä näyte steriiliin astiaan ennen hiivausta ja näytettä inkuboidaan. Jos näytteessä kasvaa kontaminaatio pian, yhden tai kahden päivän päästä näytteen ottamisesta, voidaan erä todeta kontaminoituneeksi. Valitsemalla näytteenottokohta prosessista, voidaan kontaminaation lähde paikantaa. [White & Zainasheff 2010: 220–221.]

#### 4.4 Hiivan propagointi panimolla

Panimon saatua laboratoriossa kasvatettua hiivaa, sen tehtäväksi jää propagoida hiivaa riittävä määrä ensimmäiseen fermentointiin. Jokainen propagointivaihe on riskialtis kontaminaatiolle; kontaminaatio propagointivaiheessa voi mahdollisesti pilata koko hii-

vaerän. Siksi panoshiivaa propagoidessa on tilojen ja laitteiden kannalta noudatettava parhaita mahdollista hygieniää [Briggs yms. 2004: 488.] Hiivan propagoinnin tarkoituksena ei ole vain kasvattaa mahdollisimman paljon hiivasoluja, vaan mahdollisimman tervettä hiivaa. Pienempi määrä tervettä hiivaa takaa paremman fermentoinnin kuin suurempi määrä huonokuntoista hiivaa. Siksi on tärkeää kiinnittää huomiota solukonsentraation lisäksi hiivan elävyyteen. [White & Zainasheff 2010: 127.]

Kuten mainittu kappaleessa 3.2; Stadin Panimo hankkii uudet hiivakannat kaupallisilta toimijoilta. Toimittajasta riippuen uuden hiivakannan tilavuus ja solumäärä vaihtelevat, 35 ml:sta kahteen litraan konsentroitua hiivalietettä. Valitusta toimittajasta, käytettävistä laitteista, vierteen määrästä ja vahvuudesta sekä ajasta riippuen hiivan propagointi tapahtuu panimolla 1–3 vaiheessa.

Hiivan ravintoalustana käytetään panimon omaa vierrettä, mallasuutteesta valmistettavaa vierrettä tai kokonaan synteettistä ravintoalustaa. On kuitenkin suositeltavaa käyttää samanlaista vierrettä kuin tulevassa fermentoinnissa; tämä ei ole oleellista hiivan kasvun kannalta mutta hiivan kasvatuksessa käytettävä alusta päättyy myös tulevaan fermentointiin ja voi mahdollisesti vaikuttaa oluen makuun. Hiivasuspensio voidaan myös laskeuttaa kylmässä, jolloin ylimääräinen kasvatusalusta on mahdollista erottaa ja näin minimoida sen vaikutus oluen makuun. Kasvatusalustan uutepitoisuus ei saa olla liian korkea, suositeltava uutepitoisuus on 7,5–11,5 °P. Liian korkea uutepitoisuus alentaa hiivan elävyyttä, mikä johtuu kasvavan hiivan herkkyydestä etanolille. [Briggs yms. 2004: 488].

Ensimmäisen oluterän fermentoinnin tulisi olla kestoltaan, käymisasteeltaan ja hiivan kasvultaan panimon normaalien käymisten mukainen. Tämän varmistamiseksi ensimmäiseen oluterään käytettävän hiivan tulisi olla mahdollisimman samankaltaisessa tilassa kuin aikaisemmassa kierrossa ollut hiivaerä. Hiivan fysiologista tilaa valmistellaan fermentointiin rajoittamalla hapen määrää viimeisessä propagointivaiheessa sekä säätämällä lämpötila samaksi kuin hiivattavan vierteen lämpötila tai hieman sitä korkeammaksi. Monet perinteiset propagointitankit muistuttavatkin käymistankkeja; niissä ei ole sekoitusta ja kasvuvaiheessa hiivan hapensaanti ei ole jatkuvaa. Käytännön ongelmaksi voi osoittautua hiivasolujen konsentraatio suspensiossa; hiivasoluja on samann verran kuin normaalin käymisen lopussa, 50–60 milj. solua/ml. Propagoinnin alhaisesta solukonsentraatiosta johtuen propagointivaiheita on tehtävä enemmän ja tämä vie ai-



kaa. Propagoitavan solumassan määrää voidaan vähentää keittämällä käymistankki ensin puolilleen ja hiivaamalla se normaalisti. Pääkäymisen jälkeen tankki täytetään jäähdytetyllä vierteellä. Tätä tekniikkaa kutsutaan tuplaamiseksi (ks. kpl 3.1). [Briggs yms. 2004: 488–489].

Moderneissa panimoissa hiivan propagointia tehostetaan voimakkaalla ilmastuksella ja korkeammalla lämpötilalla; 20–25 °C lämpötilassa täysin aerobisissa olosuhteissa tehdyssä kasvatuksessa solumäärä on lopussa normaalisti 180–220 milj. solua/ml. Kasvatus kestää 24–48 h ja käytettäessä kahta kasvatusvaihetta, propagointi kestää n. seitsemän päivää. Ilman syöttäminen hiivalle lopetetaan kasvun lakattua ja näin hiivan fysiologinen tila on lähellä panoshiivan haluttua fysiologista tilaa. [Briggs yms. 2004: 488–489].

#### 4.5 Talteenotto, säilyvyys ja uudelleenkäyttö

Propagoidun hiivakannan uudelleenkäyttö ensimmäisen käymisen jälkeen on yleinen käytäntö monissa panimoissa. Näin vältetään propagoinnin aiheuttamalta työmäärältä ja siihen kuluvalta ajalta. Kierrätyksellä on myös taloudellinen merkitys. Hiivan ominaisuuksista ja käytettävistä laitteista riippuen hiivan talteenottopaikka ja ajankohta vaihtelevat. Kuten uuden propagoidun hiivan käyttöönotossa, on myös talteen otettavan hiivan kohdalla huolehdittava hyvästä hygieniasta, sekä hiivan elävyydestä ja terveydestä.

Talteen otetun hiivan elävyys laskee mitä pidempään sitä säilytetään. Säilyttämällä hiivaa sopivissa olosuhteissa säilytysaikaa voidaan pidentää, mikä tuo joustavuutta panimon toimintaan. Vaikka hiivan kunto olisi talteenottopäivänä erinomainen, on sen kunto ja solumäärä tarkistettava ennen uuden vierteen hiivausta.

##### 4.5.1 Talteenotto

Käymistankeissa on kaksi kohtaa, joihin hiivaa kerääntyy tarpeeksi suuria määriä talteenotettavaksi; tankin pohjalle ja oluen päälle. Kaikki hiivat laskeutuvat lopulta tankin pohjalle [White & Zainasheff 2010: 148–149.] Stadin Panimolla on käytössä sylinterinmuotoiset, kartiopohjaiset tankit, jotka ovat päältä suljettuja. Hiivan kerääminen oluen

pinnalta ei ole mahdollista, koska panimolla ei ole erillistä hiivankeräys-laitetta.. Tämän takia hiiva on otettava talteen tankin kartionmuotoisesta pohjasta eikä tässä yhteydessä käsitellä hiivan talteenottoa oluen pinnalta.

Kun käyminen on ohi, hiiva alkaa pian kuluttaa varastoravinteitaan. Kartiopohjaisissa tankeissa hiivan tila heikkenee nopeasti. Tämä johtuu nestepatsaan hydrostaattisesta paineesta hiivan päällä sekä lämpötilan noususta hiivamassan keskellä. Kartiopohjaisessa tankissa hiivamassan keskiosan lämpötila voi olla jopa 5 °C korkeampi kuin kartion muissa osissa. Kartion ympärille voidaan asentaa jäähdytysvaippa, jolloin hiivan säilyvyyttä kartiossa voidaan parantaa. On tärkeää kerätä hiiva talteen mahdollisimman nopeasti häiritsemättä kuitenkaan itse käymistä. Suositeltava keräysajankohta on 1–2 päivää jäähdytyksen käynnistämisestä. Silloin käyminen on suurimmilta osin ohi ja jäähdytys saa hiivan laskeutumaan tehokkaasti kartion pohjalle. Paineen, lämpötilan ja ravinteiden loppumisen johdosta hiivan elävyys voi heiketä vuorokaudessa jopa 50 %. [White & Zainasheff 2010: 152–153.]

Kartioon laskeutunut hiiva ei ole tasalaatuista ja siksi on tärkeää erotella talteen otettava hiiva. Kartioon kertynyt hiiva voidaan jakaa kolmeen osaan. Ensimmäisenä kartion pohjalle pudonnut hiiva on laadultaan nopeasti laskeutuvaa, sillä on alhainen käymisaste ja se sisältää huomattavasti kuolleita soluja sekä rupaa. Tätä osaa hiivasta ei tulisi ottaa talteen sen huonojen ominaisuuksien vuoksi. Kartiossa muodostuneen kakun keskiosassa on hiivaa, jonka laskeutuvuus ja käymisaste ovat keskiluokkaa, siinä olevissa soluissa on vähiten mutaatioita ja kuroutumisarpia. Keskimäinen osa on hyvälaatuista hiivaa seuraaviin käymisiin. Viimeinen kolmannes on huonosti laskeutuvaa sekä hitaasti käyvää, pitkän käymisasteen omaavaa hiivaa. Huono laskeutuvuus aiheuttaa myös sameutta eikä tätä hiivaa pidä ottaa talteen. Hiiva kerätään talteen tankin pohjaputkesta. Putken suu desinfioidaan ja siihen liitetään desinfioitu siirtoletku, joka johdetaan säilytysastiaan. Tankissa on oltava ylipainetta tai venttiili korvausilmaa varten. Ensimmäisenä tankista tuleva hiiva on väriltään tummanruskeaa ja se on täynnä rupaa. Tämä hiiva lasketaan viemäriin. Hiivan väri alkaa vaalentua ja ruvan määrä vähenee, tämä ydinhiiva otetaan talteen keräysastiaan ja viimeistä kolmannesta ei myöskään oteta talteen. [White & Zainasheff 2010: 154–155.]

Edellä mainittu hiivan jakautuminen kartion pohjalle voi vaihdella hiivakannan, tankin muotojen, vierteen ominaisuuksien ja käymislämpötilojen mukaan. Parhaaseen loppu-

tulokseen pienpanimossa päästään käytännön kokemuksen kautta. Mittaamalla solukonsentraatio ja elävyys talteenotettavista jakeista saadaan käsitys, mikä osa kartiossa olevasta hiivasta on parhaiten soveltuvaa seuraaviin käymisiin. [White & Zainasheff 2010: 154–155.]

#### 4.5.2 Hiivan säilyvyys

Olisi suotavinta käyttää talteen otettu hiiva samana päivänä. Näin hiivan fysiologinen tila ei ehtisi heiketä eikä mahdollisilla kontaminaatioilla olisi mahdollisuutta kasvaa. Tämä ei kuitenkaan ole aina mahdollista tankkikapasiteetin takia, jolloin hiivaa joudutaan säilyttämään seuraavaan keittoon asti. Hiivan säilyvyyteen vaikuttaa useita tekijöitä:

- Hiivan kunto talteenottohetkellä
- Keräyskohta: tankin pohjalta vai pinnalta?
- Minkälaisen oluen hiiva oli fermentoinut?
- Käytetty hiivakanta
- Säilytysolosuhteet

Talteenotetusta hiivasta olisi aina mitattava solukonsentraatio, elävyys ja puhtaus. Lähtökohtaisesti hiivan elinkyky heikkenee varastoinnin aikana, joten valmiiksi huonokuntoista hiivaa ei voida säilyttää pitkiä jaksoja. Panimolla onkin selvittävä, missä vaiheessa käymistä hiiva voidaan kerätä talteen häiritsemättä itse käymistä, mutta samalla hiivaan kohdistuvaa rasitusta pitää minimoida. Käyvän oluen pinnalta saadaan perinteisesti kerättyä elinvoimaisempaa hiivaa kuin, tankin pohjalta, missä hiiva on altistunut hydrostaattiselle paineelle, mikä heikentää hiivan kuntoa. Myös sillä minkä tyyppisestä oluesta hiiva otetaan talteen, on merkitystä; vahvassa ja voimakkaasti humaloidusta oluesta talteen otettu hiiva on stressaantunut ja heikko. Sekä korkea isomeroituneiden alfa-happojen määrä sekä korkea alkoholipitoisuus ovat haitallisia hiivalle. Osalla alfa-happojen komponenteista on ominaisuus tarttua joidenkin bakteerien solukalvoille estäen niiden lisääntymistä, mutta näin voi käydä myös hiivoille. Korkea alkoholipitoisuus aiheuttaa hiivalle stressiä heikentäen sen elinkykyä. Myös hiivakantojen välillä on eroja: puhtaat Ale- sekä Lager-kannat kestävät säilytystä, kun taas voimakkaita hedelmäisiä käymisaromeja tuottavat ja voimakkaasti flokkaantuvat kannat ovat epästabiileja. Kaik-

kein epästabiileimpia kantoja ovat saksalaiset vehnähiivakannat. Suurin merkitys hiivan säilyvyydelle on kuitenkin säilytysolosuhteilla sekä sillä, kuinka pitkä aika on talteenoton ja uudelleenhiivauksen välissä. [White & Zainasheff 2010: 157–161.]

Kerätyn hiivan säilytysolosuhteet ovat samanlaiset kuin propagoidun hiivan (kpl 4.2.2): lämpötilan tulee olla välillä 0–4 °C, hiiva ei saa kuitenkaan missään tapauksessa jäättyä. Hiivaa voidaan hyvin säilyttää samassa oluessa, jossa se on käynyt, poikkeuksena vahvat ja katkerat oluet. Tällöin vaihtoehtona voidaan käyttää steriiliä vettä tai fysiologista suolaliuosta. Hiivan tulisi säilytyksen aikana pysyä lepotilassa, joten ravinteita sisältävää alustaa ei suositella, lisäksi ravinteet myös mahdollistavat pilaajamikrobien kasvamisen. Hiivan säilytykseen pienpanimossa soveltuu hyvin niin kutsuttu Cornelius-astia. Paineliittimien ansiosta hiiva voidaan siirtää hygieenisesti vierteeseen hiilidioksidin avulla. Säilytyksen aikana on muistettava huolehtia siitä, ettei astiaan kerry liikaa painetta, mikä heikentää hiivan kuntoa. Yksinkertaisempi säilytystapa on teräksinen tai muovinen ämpäri. Ämpärin suurin heikkous on hiivan siirrossa tankkiin: hiiva on kaadettava tankkiin miesluukusta ja tällöin hiiva ja vierre altistuvat kontaminaatiolle. [White & Zainasheff 2010: 157, 160–161.]

#### 4.5.3 Uudelleenkäyttö

Uudelleen käytettävän hiivan kunto ja puhtaus määritetään ennen käyttöä. Hiivasta mitataan solumäärä, elävyys, puhtaus sekä elinkyky. Suositellaan että hiivaa, jonka elävyys on alle 90 %, ei oteta uudelleen käyttöön. Hiiva joko hylätään, elvytetään tai annostusta nostetaan kompensoimaan alhaista elävyyttä. Jos hiivan elävyys on liian alhainen, voi fermentoinnissa ilmetä ongelmia, kuten vääristyneitä aromeita ja huono käymisaste. Panimolla tulisikin olla hiivaa sen varalle, että ensisijaisessa hiivassa ilmenee ongelmia. Hiivan uudelleenkäyttökertojen lukumäärä riippuu hiivakannasta, valmistettavista oluista sekä talteenottotekniikasta sekä säilytysolosuhteista ja -ajasta. Niin kauan kuin hiivan fermentoimat oluet ovat hyväksyttävissä rajoissa, oluiden aromiprofiili on halutun kaltainen ja hiiva pysyy puhtaana kontaminaatioista, hiivaa voidaan käyttää uudestaan. Lopulta hiivaan kohdistuva selektiivinen paine ja solujakautumisten myötä tapahtuvat mutaatiot muuttavat hiivakantaa niin, että fermentointikyky tai hiivan tuottama makuprofiili muuttuvat epäedullisiksi. Tällöin vanha hiivakanta on hylättävä ja aloitettava uuden hiivakannan propagointi. [White & Zainasheff 2010: 157, 160–165.]

Hiivaa jonka elävyys on matala (<90 %), voidaan yrittää elvyttää. Elvytys tapahtuu keit-topäivän aamuna. Hiivaa punnitaan riittävä määrä puhtaaseen astiaan ja lämpötilan annetaan asettua 21–24 °C:seen, mutta lämpötila ei saa nousta liian nopeasti. Joukkoon lisätään keitettyä, jäähdytettyä vahvaa vierrettä ½ litraa kymmentä hiivalittraa kohden. Hiiva pidetään 21–24 °C:ssa 4–12 tunnin ajan ilman ilmastusta tai sekoitusta. Elävä, aktiivinen hiiva muuttaa suspension kermamaiseksi. Kuolleet solut ja muu joukkoon kuulumaton kuiva-aine laskeutuu astian pohjalle. Suspension pinnalla oleva aktiivinen hiivakerma dekantoidaan samana päivänä keitetyn vierteen joukkoon, kuolleet hiivasolut jäävät astian pohjalle. [White & Zainasheff 2010: 166–167.]

## KOKEELLINEN OSUUS

Nestemäisen hiivalietteen ja vierteen tavoiteltu solukonsentraatio määrittävät, kuinka paljon nestemäistä hiivaa vierteen hiivaukseen tarvitaan. Tarvittavan hiivalietteen määrä antaa mittasuhteet hiivan propagointioperaation koolle panimolla. Vierteen hiivausmäärällä on myös vaikutusta käymisen kestoon, käymisasteeseen sekä oluen aistittaviin ominaisuuksiin.

Tämän insinööriyön kokeellisessa osassa tehtiin hiivan propagointikoe pienessä mittakaavassa. Tarkoituksena oli selvittää, kuinka paljon aikaa tarvittavan solumäärän propagointi vaatii ja kuinka suuria tilavuuksia joudutaan käsittelemään. Työssä tutkittiin panimon toivomuksesta myös vierteen hiivausmäärän vaikutusta vierteen käymisnopeuteen valituilla Ale- ja Lager-hiivakannoilla. Hiivausmäärän vaikutusta oluen aistittaviin ominaisuuksiin ei otettu kokeissa huomioon.

## 5 Hiivakokeiden kulku

### 5.1 Koepropagointi

Insinööriyössä suoritettiin kaksi koepropagointia Metropolia Ammattikorkeakoulun mikrobiologian laboratorioden tiloissa. Kokeiden tarkoituksena oli selvittää kuinka nopeasti hiivan solumäärä lisääntyy. Kasvua seurattiin laskemalla solumäärä ja elävyys hemocytometrillä ja metyleenisini-värjäyksellä kerran vuorokaudessa. Propagointeihin valittiin hiivaksi Wyeastin American Ale II -hiivakanta, joka hankittiin Myyrmäen Viinimaailmasta.

#### 5.1.1 Ensimmäinen propagointi

Ensimmäisessä propagoinnissa kasvatustilavuus oli 5 litraa. Propagointiastiana toimi lasinen, pisaran muotoinen astia, joka desinfioitiin kiehuvalle vedelle. Alustana oli Stadin Panimon ale-vierrettä (19 °P), joka oli laimennettu 10,8 °P:oon. American Ale II -hiivapussi aktivoitiin ja sen annettiin turvota. Paketti aktivoidaan rikkomalla ravinnepussi paketin ulkopuolelta painamalla ja paketin annetaan turvota 3–12 tuntia. Kun paketti on turvonnut, sisällä oleva hiiva on alkanut kasvaa. Paketissa oli 725 miljoonaa so-

lua/ml ja sen elävyys oli 87 %. Näin ollen elävien solujen määräksi saatiin 628 miljoonaa solua/ml. Hiivasuspensiota hiivattiin vierteeseen 100 ml, jolloin propagoinnin lähtösolumääräksi saatiin laskennallisesti 12 miljoonaa solua/ml. Propagointi tapahtui huoneenlämmössä 21 °C:ssa ilman jäädytystä, joten hiivan tuottama lämpö mahdollisesti nosti vierteen lämpötilaa propagoinnin aikana. Liuosta ilmastettiin akvaariopumpulla, jonka tuotto täydellä teholla oli 4800 cm<sup>3</sup>/min. Ilma suodatettiin letkuun liitetyllä steriilisuodattimella ja letkun päässä oli sintteri ilmakuplien koon pienentämiseksi. Kasvatuksesta otettiin kerran vuorokaudessa näyte, josta mitattiin solumäärä, elävyys ja uutepitoisuus. Propagointia jatkettiin 3 vuorokautta. Propagoinnin aikana havaittiin, että vierre vaahtoa voimakkaasti. Vaahtaminen oli niin voimakasta, että vaahtokukka pyrki tulemaan propagointiastiasta ulos. Propagoinnin tulokset ja niiden tarkastelu on esitetty luvussa 6.

#### 5.1.2 Toinen propagointi

Toisessa propagoinnissa oli kaksi rinnakkaista kasvatusta, joista toista ilmastettiin (A) ja toista ei (B). Syy ilmastamatta jättämiseen oli ensimmäisessä propagoinnissa havaittu voimakas vaahtaminen. Näin pyrittiin selvittämään kasvaako hiiva riittävästi ilman voimakasta ilmastusta. Tällä kertaa propagoinnit aloitettiin huomattavasti pienemmällä solumäärällä, jolloin saatiin käsitys siitä, kuinka pienestä hiivaympistä voidaan lähteä liikkeelle. Propagoinnit tehtiin 2 litran Erlenmeyer-pulloissa ja molempien pullojen solumäärä oli propagoinnin alussa 0,375 miljoonaa solua/ml, siis vain 3 % edellisen kokeen solumäärästä. Propagointi kesti 4 vuorokautta ja molemmista pulloista otettiin kerran vuorokaudessa näyte, josta mitattiin solumäärä ja elävyys, pH ja uutepitoisuus. Propagoinnin tulokset ja niiden tarkastelu on esitetty luvussa 6.

#### 5.2 Käymiskokeet

Käymiskokeissa määritettiin kaupallisen hiivasuspension solukonsentraatio hemosytoometrillä ja elävyys metyleeninsini-värijäyksellä. Solumäärän ja elävyyden määrittämisen jälkeen 100 ml vierrettä hiivattiin eri solumäärillä ja käymisen etenemistä seurattiin hiilidioksidin syntyemisestä johtuvana painon pudotuksena.

Käymiskokeisiin valittiin panimon toivomuksesta yksi pintahiiva ja yksi pohjahiiva. Ko-  
keessa käytetyt hiivakannat olivat Wyeastin American Ale II -pintahiiva sekä Whitelab-  
sin American Lager WLP840 -pohjahiiva. American Ale II -hiiva haettiin Myyrmäen Vii-  
nimaailmasta ja WLP840 tilattiin verkkokaupasta panimolle.

### 5.2.1 American Ale II

Ennen kokeiden aloitusta kaupallisella hiivakannalla selvitettiin Metropolia Ammattikor-  
keakoulun pakkasessa säilytetyn American Ale II hiivakannan elävyys. Pakastettu hiiva  
temperoitui huoneenlämpöön vesihauteessa ja suspensiosta valmistettiin laimennok-  
set  $1:10^1$ – $1:10^7$  jotka viljeltiin kahdelle rinnakkaiselle mallasuute-agarille. Maljoja tem-  
peroitui  $27\text{ °C}$ :ssa 4 päivää. Yhdelläkään maljalla ei esiintynyt kasvua. Hiivaa tarkastel-  
tiin myös mikroskoopilla metyleeninsinisellä ja todettiin hiivan olevan kokonaan kuollut.  
Hiiva oli pakastettu ilman jäätyminenestoainetta, joka olisi estänyt jääkiteiden muodos-  
tumisen soluihin jäätyksen aikana. Jääkiteet voivat rikkoa solujen rakenteen, mikä  
johtaa niiden kuolemaan. Pakastetun hiivan huonon elävyyden takia päätettiin hankkia  
hiiva Myyrmäen Viinimaailmasta.

Suoritettiin kaksi koesarjaa, joissa molemmissa 100 ml:aan noin  $10\text{ °P}$  vierrettä annos-  
teltiin 1, 3, 6, 8 ja 12 milj. solua/ml. Jokaisesta hiivausmäärästä oli 4 Erlenmeyer-pulloa:  
kaksi rinnakkain pöydällä ja kaksi ravistelussa 70 rpm ja kaikki pullot fermentoitui huo-  
neenlämmössä. Käymisen etenemistä seurattiin kunkin pullon painon muutoksesta  
oletuksella, että hiiva fermentoi yhdestä grammasta sokeria 0,5 g etanolia ja 0,5 g hiili-  
dioksidia. Haihtuvan hiilidioksidin määrän perusteella voitiin tarkkailla käymisen etene-  
mistä.

Myyrmäen Viinimaailma -myymälästä haettiin Wyeastin American Ale 2 *Activator Pack*.  
Paketti sisältää 125 ml lepotilassa olevaa hiivaa sekä ravinnepussin. Paketti aktivoitiin  
ja avattiin, sen solukonsentraatio ja elävyys määritettiin hemosytometrillä ja mety-  
leeninsinisellä. Molemmissa koesarjoissa oli oma hiivapakettinsa. Hemosytometrillä teh-  
dyn mittauksen mukaan hiivan elävyys ja solumäärä pakkauksissa vaihtelivat hieman.

Viirteenä käytettiin Stadin Panimolta haettua  $20\text{ °P}$  Ale-vierrettä, joka keitettiin ja lai-  
mennettiin  $10,1\text{ °P}$ :hon vedellä, jäähdytettiin  $21\text{ °C}$ :seen ja sitä annosteltiin mittapipetil-  
lä 100 ml 250 ml Erlenmeyer-pulloihin. Pullot oli desinfioitu kiehuvalle vedelle. Hii-



vasuspensiosta mitatun solukonsentraation ja elävyyden perusteella eläviä soluja annosteltiin mittapipetillä 1, 3, 6, 8 ja 12 milj. solua/ml. Toisen koesarjan vierre tehtiin spraykuivatusta mallasuutteesta, josta valmistettiin 10,0 °P vierre.

Käymistä seurattiin punnitsemalla pulloja vaa'alla ja vertaamalla painoja alkuperäisiin painoihin. Käymisten rinnalla oli 4 pulloa, joissa oli pelkkää vettä haihtumisen vaikutuksen arvioimiseksi. Taulukoissa 2 ja 3 on esitetty koeasetelma ja hiivan erätiedot.

Taulukko 2. Ensimmäisen käymiskokeen koeasetelma ja hiivan tiedot.

Wyeast American Ale II 1272. Valmistettu 25.12.2013. Erä 1030329.				
Tunnus	milj. solua/ml	Ravistelu	Lämpötila °C	°P
A1	1	Ei	21	10,1
A2	1	Kyllä	21	10,1
B1	3	Ei	21	10,1
B2	3	Kyllä	21	10,1
C1	6	Ei	21	10,1
C2	6	Kyllä	21	10,1
D1	8	Ei	21	10,1
D2	8	Kyllä	21	10,1
E1	12	Ei	21	10,1
E2	12	Kyllä	21	10,1
Vesi1	0	Ei	21	0
Vesi2	0	Kyllä	21	0

Ensimmäisen koesarjan hiivapaketin solukonsentraatio oli hemosytometrillä mitattuna 751 miljoonaa solua/ml. Metyleenisini -värjäys antoi elävyydeksi 94 %, näin ollen eläviä soluja oli 709 miljoonaa solua/ml. Kun hiivasuspension elävien solujen konsentraatio oli tunnettu, niin hiivaa annosteltiin mittapipetillä tunnettu määrä ja näin saavutettiin lähtötilanteessa haluttu solukonsentraatio

Taulukko 3. Toisen käymiskokeen koeasetelma ja hiivan tiedot.

Wyeast American Ale II 1272. Valmistettu 11.9.2014. Erä 0637254				
Tunnus	milj. solua/ml	Ravistelu	Lämpötila °C	°P
A1	1	Ei	21	10,0
A2	1	Kyllä	21	10,0
B1	3	Ei	21	10,0
B2	3	Kyllä	21	10,0
C1	6	Ei	21	10,0
C2	6	Kyllä	21	10,0
D1	8	Ei	21	10,0
D2	8	Kyllä	21	10,0
E1	12	Ei	21	10,0
E2	12	Kyllä	21	10,0
Vesi1	0	Ei	21	0
Vesi2	0	Kyllä	21	0

Toisen koesarjan hiivapaketin solukonsentraatio oli hemosytometrillä mitattuna 604 miljoonaa solua/ml. Metyleenisininen -värjäys antoi elävyydeksi vain 40,3 %, näin ollen eläviä soluja oli 243 miljoonaa solua/ml. Hiivasuspensiota annosteltiin kuten edellä. Koesarjojen tulokset ja niiden tarkastelu on esitetty luvussa 6.

### 5.2.2 WLP840

Stadin Panimo tilasi WLP840 -hiivaa verkkokaupasta panimolle. Hiiva myydään 35 ml kierrekorkillisessa muoviputkilossa. Toisin kuin American Ale II, WLP840 ei sisällä ravinnepussia, jolla hiiva aktivoidaan.

Lager hiivalla suoritettiin myös kaksi koesarjaa, missä 100 ml vierrettä hiivattiin kontrolloidulla hiivamäärällä. Hiivamäärät olivat 2, 4, 6, 8 ja 12 milj. solua/ml ja vierteiden vahvuudet 10,2 ja 10,9 °P. Käymislämpötila oli 15 °C ja kaikki pullot olivat ravistelussa 80 rpm. Jälkimmäisen koesarjan vierre valmistettiin spraykuivatusta mallasuutteesta, koska panimolta haettu vierre loppui. Taulukoissa 4 ja 5 on esitetty koesarjojen koeasetelma ja hiivan erätiedot.

Taulukko 4. Lager hiivan ensimmäisen koesarjan koeasetelma ja hiivan erätiedot.

Whitelabs American Lager WLP840. Parasta ennen 3.6.2014. Erä 1004532				
Tunnus	milj. solua/ml	Ravistelu	Lämpötila °C	°P
A1	2	Kyllä	15	10,2
A2	2	Kyllä	15	10,2
B1	3	Kyllä	15	10,2
B2	3	Kyllä	15	10,2
C1	6	Kyllä	15	10,2
C2	6	Kyllä	15	10,2
D1	8	Kyllä	15	10,2
D2	8	Kyllä	15	10,2
E1	12	Kyllä	15	10,2
E2	12	Kyllä	15	10,2
Vesi1	0	Kyllä	15	0
Vesi2	0	Kyllä	15	0

Ensimmäisen Lager koesarjan hiivapaketin solukonsentraatio oli hemosytometrillä mitattuna 2 miljardia solua/ml. Metyleenisininen -värjäys antoi elävyudeksi 92,5 %, näin ollen eläviä soluja oli 1,85 miljardia solua/ml. Hiivaa annosteltiin elävien solujen mukaan laskemalla tarvittava määrä hiivasuspensioita halutun solumäärän saavuttamiseksi.

Taulukko 5. Lager hiivan toisen koesarjan koeasetelma ja hiivan erätiedot.

Whitelabs American Lager WLP840. Parasta ennen 9.3.2015. Erä 1012288				
Tunnus	milj. solua/ml	Ravistelu	Lämpötila °C	°P
A1	2	Kyllä	15	10,9
A2	2	Kyllä	15	10,9
B1	3	Kyllä	15	10,9
B2	3	Kyllä	15	10,9
C1	6	Kyllä	15	10,9
C2	6	Kyllä	15	10,9
D1	8	Kyllä	15	10,9
D2	8	Kyllä	15	10,9
E1	12	Kyllä	15	10,9
E2	12	Kyllä	15	10,9
Vesi1	0	Kyllä	15	0
Vesi2	0	Kyllä	15	0

Toisen Lager koesarjan hiivapakettien solukonsentraatio oli hemosytometrillä mitattuna 2 miljardia solua/ml. Metyleenisini -värjäys antoi elävyydeksi vain 33 %, näin ollen eläviä soluja oli 653 miljoonaa solua/ml. Hiivaa annosteltiin kuten edellä.

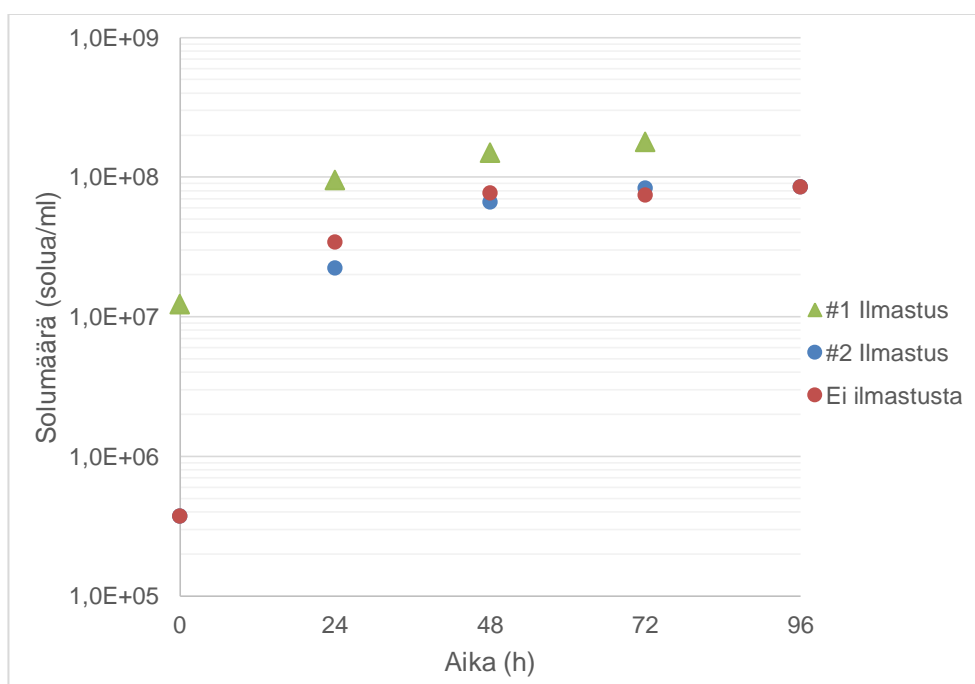
Ensimmäisessä ja toisessa lager-hiivan käymiskokeessa käytettyjen hiivapakettien elävyydet erosivat toisistaan merkittävästi, ensimmäisen kokeen paketin elävyys oli 92,5 % ja toisen 33,0 %. Mahdollisia syitä isolle eroavuudelle on monta: pakettien parasta ennen päivämäärä, kuljetus- ja säilytysolosuhteet, vaihtelevuus eri valmistuserien välillä ja myös itse elävyyssmittaus. Hiivapakettien parasta ennen päiväykset osoittivat, että ensimmäinen hiivapaketti oli lähempänä parasta ennen päivämääräänsä kuin jälkimmäinen paketti. Vanhemmassa paketissa oli parempi elävyys, mikä mahdollisesti viittaa säilytysolosuhteisiin (lämpötilaan) tai eräkohtaiseen vaihteluun. Molempien hiivapakettien elävyys mitattiin kaksi kertaa ja tulosten perusteella eroavuus ei johtunut mittausvirheestä. Koesarjojen tulokset ja niiden tarkastelu on esitetty luvussa 6.

## 6 Tulokset ja tulosten tarkastelu

Tulokset ovat esitetty kuvaajina havainnollistamisen helpottamiseksi. Propagointien solumäärät on ilmoitettu elävinä soluina/ml, joten tuloksissa on otettu huomioon hiivan elävyys.

### 6.1 Propagointien tulokset

Kuvassa 4 on esitetty ensimmäisen ja toisen propagoinnin solukonsentraatiot yksikössä solua/ml ajan funktiona. Kuvaajan y-akseli on logaritminen.



Kuva 4. 1. ja 2. Ale-hiivan propagointien tulokset.

Ensimmäisen propagoinnin alussa soluja oli 12 miljoonaa solua/ml ja elävyys oli 87 %. Vuorokauden kuluttua solukonsentraatio oli kasvanut 95 miljoonaan soluun/ml ja elävyys parantunut 98 %:iin. Toisen ja kolmannen vuorokauden aikana solukonsentraatio kasvoi 150 miljoonaan ja 180 miljoonaan soluun/ml. Hiivan elävyys ei kasvanut ensimmäisen vuorokauden lukemasta tulosten ollessa toisen ja kolmannen vuorokauden kohdalla 97 ja 94 %. Propagoinnissa solumäärä kasvoi lähes 8 kertaiseksi ensimmäisen vuorokauden aikana. Samalla hiivan elävyys nousi lukemaan, jollaista hyvältä pa-

noshiivalta toivotaan. Kahden viimeisen vuorokauden aikana hiivan solumäärä kasvoi, mutta hitaammin. Myöskään hiivan elävyys ei parantunut, vaan se jopa laski viimeisen kahden vuorokauden aikana hieman. Lasketaan hiivan spesifinen kasvunopeus,  $\mu$  ja generaatioaika  $t_d$ , eli aika, joka hiivasoluilla kestää kaksinkertaistua sen hetkellä kasvunopeudella. Ensimmäisen vuorokauden spesifinen kasvunopeus oli 0,085 / h, ja generaatioaika 8,12 tuntia. Toisen vuorokauden aikana, kun kasvu on kuvaajan perusteella selvästi hidastunut, kasvunopeus oli 0,018 / h ja generaatioaika oli kasvanut 37 tuntiin. Kasvunopeuden ja generaatioajan kaavat on esitetty liitteessä 3.

Toisessa kasvatuksessa solumäärä kasvoi molemmissa kokeissa lähtötasosta (0,375 miljoonaa solua/ml) huomattavasti, samoin elävyys (76 %). Ilmastetun propagoinnin solumäärä ensimmäisen vuorokauden jälkeen oli 22,4 miljoonaa solua/ml ja elävyys oli 94 %. Ilmastamattoman propagoinnin solumäärä oli 34,3 miljoonaa solua/ml ja elävyys 89 %. Ottaen huomioon solujen alhaisen lähtötason, solujen kasvu oli todella voimakasta. Ilmastetun ja ilmastamattoman kasvatuksen spesifinen kasvunopeus ( $\mu$ ) ensimmäisen vuorokauden aikana oli 0,170 / h ja 0,188 / h ja generaatioajat olivat 4,0 ja 3,7 tuntia. Vuorokauden jälkeen kasvu hidastui sekä ilmastetussa että ilmastamattomassa pullossa samalla tavalla kuin ensimmäisessä propagoinnissa. Lopussa ilmastetun ja ilmastamattoman propagoinnin solumäärä neljän vuorokauden jälkeen oli 85,3 ja 85,2 miljoonaa solua/ml ja elävyys oli molemmissa noussut 98 %:iin. Kasvunopeuden ja generaatioajan kaavat on esitetty liitteessä 3.

Molemmissa propagoineissa kasvu hidastuu huomattavasti 2–3 vuorokauden kuluttua kasvatuksen aloittamisesta. Vaikka ilmastetuissa pulloissa hiivalla on happea saatavilla, se on kuluttanut vierteessä olevat ravinteet loppuun, ravinteiden määrän hiipuessa se alkaa varautumaan niiden loppumiseen ja tuottaa varastoravinteita. Ilmastamattoman kasvatuksen kasvunopeuden hiipuminen johtuu oletettavasti samasta syystä. Lisäksi ilmastamattoman hiivan tuottama etanoli voi vaikuttaa kasvuun rajoittavasti.

Elävyyden kasvu propagointien alussa on merkki siitä, että vierteessä on ollut riittävästi happea hiivan käyttöön. Hiiva on syntetisoinut steroleita, jotka ovat tärkeä osa sen solumembraania. Kun hiivalla on tarpeeksi happea käytössä, on uusien hiivasolujen kurotuminen mahdollista.

Kasvatukset osoittivat, että solumäärä voidaan moninkertaistaa jo yhden vuorokauden kasvatuksella. Käytännössä yhden kasvatusvaiheen kestoksi voidaan asettaa yksi vuorokausi, mutta hiiva pysyy kokeiden mukaan elinvoimaisena aina 4 vuorokauteen asti. Tämä mahdollistaa joustavamman aikataulun panoshiivojen propagoinnille. Lähtökohdat sille, kuinka monta kasvatusvaihetta panimolla tarvitaan, määräytyvät kasvatuksen tilavuuden ja alkutason solumäärän mukaan. Kasvatusten solumäärä alkuhetkellä oli erilainen; ensimmäisessä kasvatuksessa oli 12 miljoonaa solua/ml kun toisessa kasvatuksessa molemmissa astioissa oli 375 tuhatta solua/ml. Kasvatuksen alussa olevalla solukonsentraatiolla näyttäisi olevan vaikutusta rajallisessa ajassa saavutettavaan solumäärään. Tämä on otettava huomioon, kun harkitaan mistä uusi hiivakanta hankitaan. Jos uutta hiivaa saadaan paljon, riittää pienempi kasvatuksen tilavuus tai vähemmän kasvatusvaiheita, kun taas lähdetäessä liikkeelle pienemmästä kokonaissolumäärästä on kasvatuksen tarve suurempi. Toisen kasvatuskokeen mukaan jatkuva ilmastus ei ole välttämätöntä, vaan hiivasolut lisääntyvät tehokkaasti myös ilman ilmastusta. Näin ei synny ongelmaa vierteen liian voimakkaasta vaahtoamisesta. Vierrettä voidaan kuitenkin ilmastaa kasvatuksen alussa, jolloin hiivalla on riittävästi happea saatavilla.

Stadin Panimon hiivausmäärät 4,7 % Lager ja Ale- oluelle kuivahiivaa käytettäessä ovat olleet 4,5 ja 3 miljoonaa solua/ml [Gren 2015]. Jos nämä hiivausmäärät asetetaan tavoitteeksi, voidaan laskea kuinka paljon hiivalietettä vierteen hiivaukseen tarvitaan. Taulukossa 6 on esitetty, kuinka paljon hiivalietettä, jossa on vaihteleva solupitoisuus, tarvitaan edellä mainittujen hiivausmäärien saavuttamiseksi. Laskuissa on käytetty hiivattavan vierteen tilavuutena Stadin Panimon yhden keiton tilavuutta, 1000 litraa.



Taulukko 6. Tarvittavan hiivalietteen määrä Ale ja Lager vierteille kasvatuksessa saavutetun solukonsentraation mukaan.

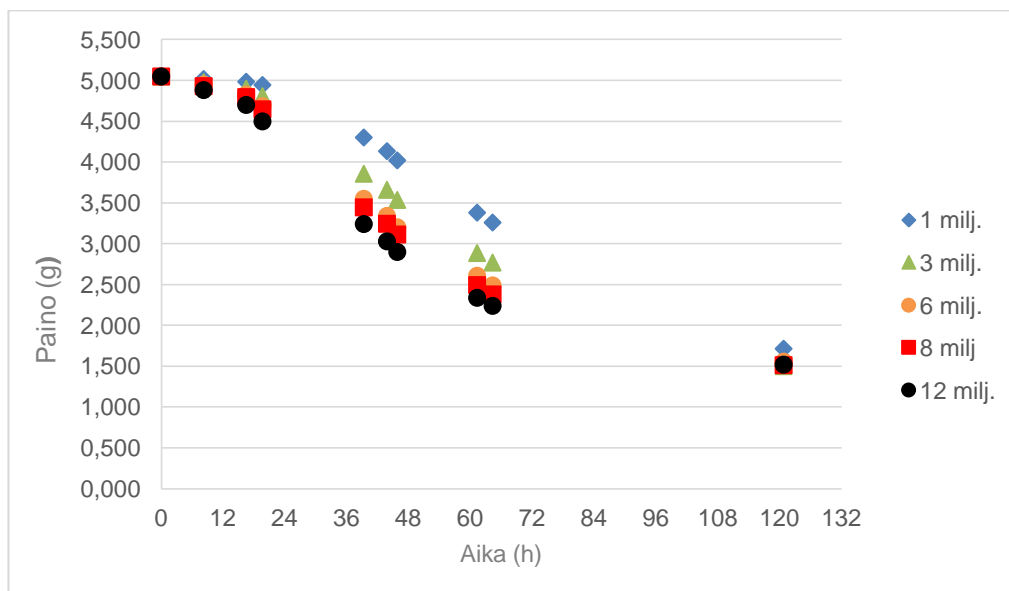
Hiivalietteen solukonsentraatio	Tarvittava hiivaliettemäärä (L / 1000 L vierrettä)	
	Ale	Lager
solua/ml		
2,00E+07	150	225
2,50E+07	120	180
3,50E+07	86	129
5,00E+07	60	90
8,50E+07	35	53
1,50E+08	20	30
1,80E+08	17	25
2,00E+08	15	23

Taulukon avulla saadaan käsitys siitä, millaisia tilavuuksia joudutaan käsittelemään eri solukonsentraatioilla. Ensimmäisen kasvatuksen solukonsentraatio oli 180 miljoonaa ( $=1,8E+8$ ) solua/ml, jolloin hiivalietettä tarvittaisiin Lagerille 25 litraa ja Alelle 17 litraa. Toisen kasvatuksen solukonsentraatiot olivat noin 85 miljoonaa ( $=8,5E+7$ ) solua/ml eli hiivalietteen määrä olisi 53 ja 35 litraa.

## 6.2 Käymiskokeiden tulokset

Käymiskokeiden tulokset on esitetty pullojen painon muutoksena ajan suhteen. Rinna-  
nakkasten pullojen tuloksista laskettiin keskiarvo. Lähtöpaino on laskettu hiivalla käy-  
tettävissä olleen uutteen määrästä oletuksella, että hiiva fermentoi 1 grammasta uutet-  
ta 0,5 g etanolia ja 0,5 g hiilidioksidia, näin ollen 100 ml:sta 10 °P vierrettä voi lasken-  
nallisesti haihtua hiilidioksidia 5 grammaa. [Enari & Mäkinen 2015: 132.]

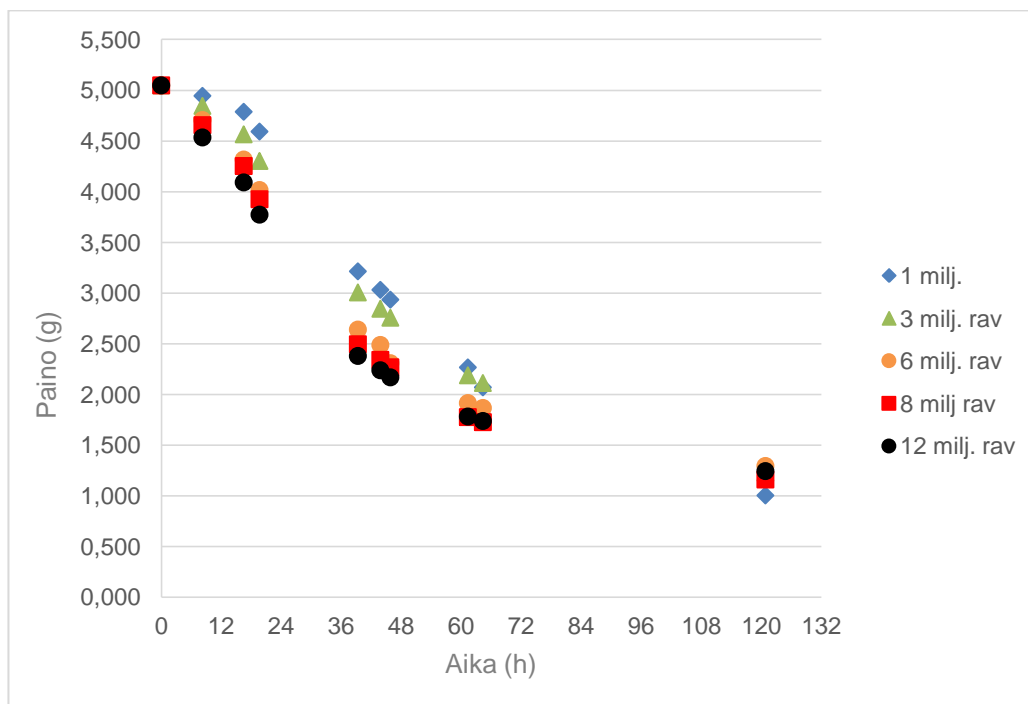
Kuvassa 5 on esitetty ensimmäisen ale-hiivan käymiskokeen tulokset pulloista ilman ravistelua.



Kuva 5. Ale-hiivalle tehdyn 1. käymiskokeen tulokset, ilman ravistelua.

Käyminen lähti kaikissa pulloissa liikkeelle samaan aikaan, mutta nopeuseroja ilmenee jo alussa eri hiivamääriä sisältävien pullojen välillä. 39 tunnin kuluttua 12 miljoonaa solua/ml sisältävä pullo on saavuttanut 35 % käymisasteen, kun vähiten soluja sisältävä pullo on saavuttanut 13,9 % käymisasteen. Muut pullot sijoittuvat kahden edellä mainitun väliin. Erot pullojen välillä pysyvät suunnilleen saman suuruisina 64 tuntiin asti. Mittauksissa on aukko 64 ja 121 tunnin välillä, koska pulloja ei päästy punnitsemaan kiireiden takia. Viimeisessä punnituksessa kaikki pullot olivat käyneet lähes yhtä pitkälle käymisasteiden ollessa 66–70 % välillä.

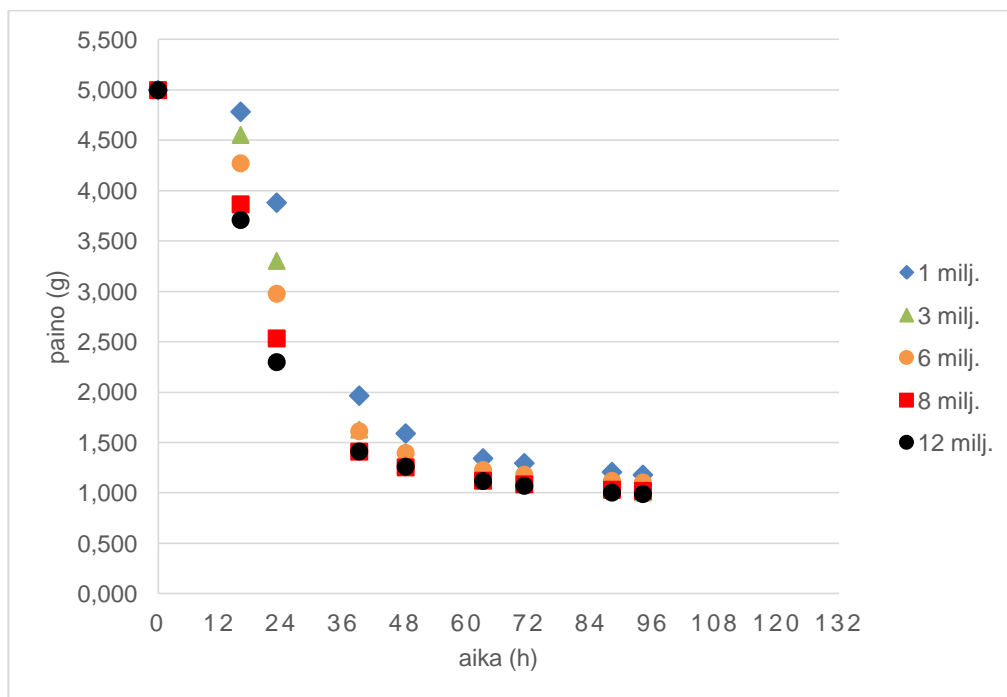
Ravistelussa olleet pullot (kuva 6) kävivät nopeammin kuin ravistelemattomat, myös niissä eniten hiivaa sisältänyt pullo kävi nopeammin kuin kaksi vähiten hiivaa sisältänyttä pulloa.



Kuva 6. Ale-hiivalla tehdyn 1. käymiskokeen tulokset, ravistelu.

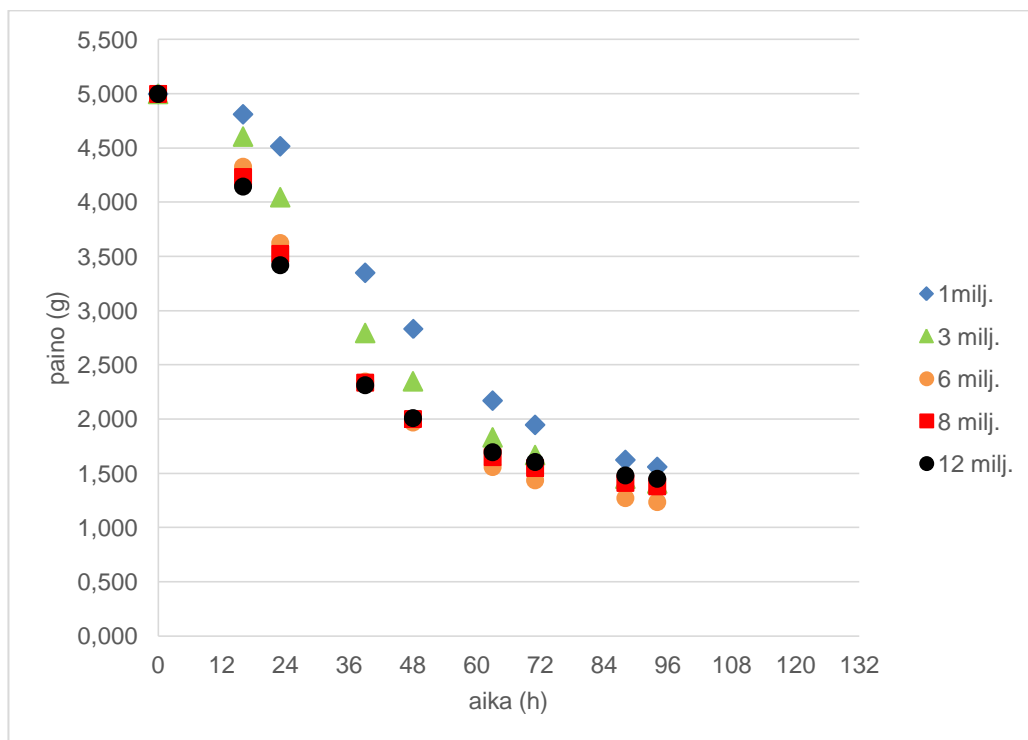
Myös kaikki ravistelussa olleet pullot kävivät yhtä pitkälle, käymisasteiden asettuessa 74–80 % väliin. On mahdollista, että pullojen painot olisivat vielä pudonneet käymisen seurauksena, mutta kokeen aikaraja ei antanut tähän mahdollisuutta.

Kuvissa 7 ja 8 (ravistelu) käymiskoe on toistettu samalla hiivalla ja hiivausmäärillä. Toistokokeessa ravistellut pullot kävivät hitaammin kuin ensimmäisessä kokeessa ja käymisaste käymisen lopussa on kaikilla samalla tasolla.



Kuva 7. Ale-hiivalla tehdyn toistokokeen käymistulokset ilman ravistelua.

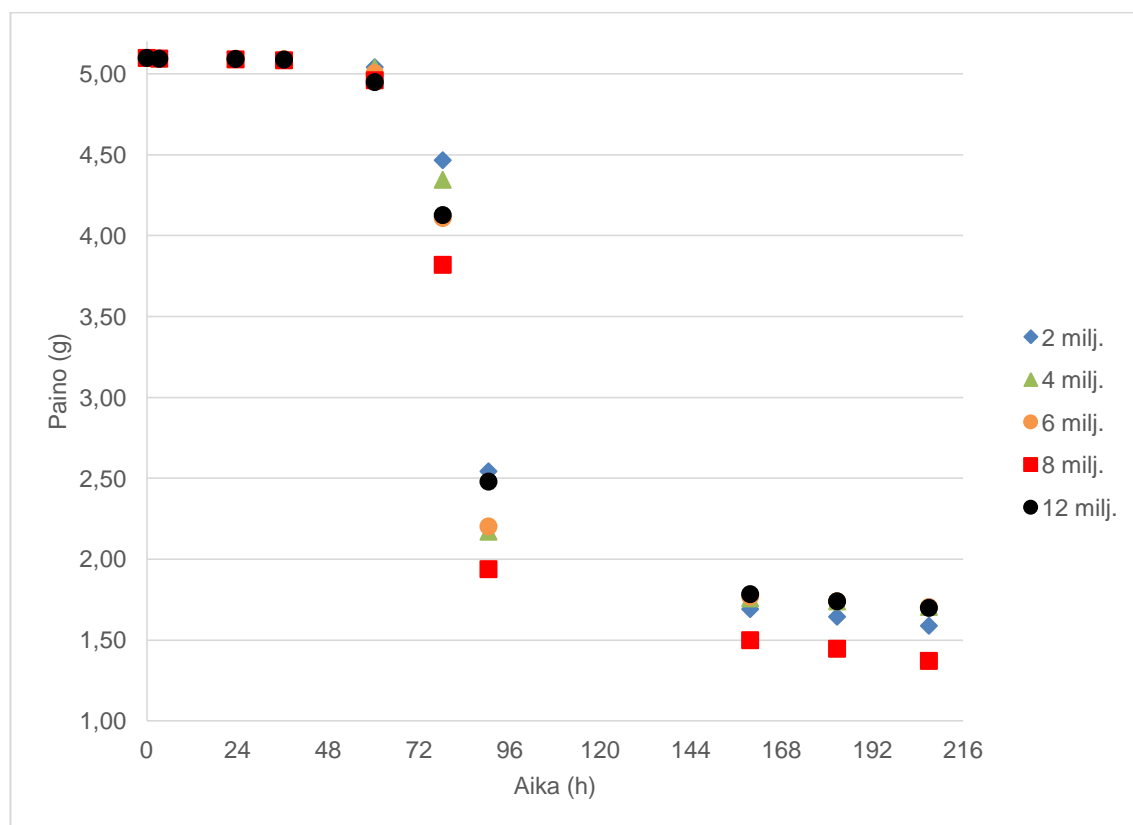
Ensimmäisen kokeen pohjalta oli odotettavissa, että ravistelussa olleet pullot kävisivät nopeammin kuin ravistelemattomat, mutta näin ei kuitenkaan käynyt. Toistokokeessa ravistelussa olleet pullot kävivät lähes yhtä nopeasti kuin 1. kokeessa, mutta toisen kokeen ravistelemattomat pullot kävivät nopeammin kuin 1. kokeen pullot siitä huolimatta että niitä ei ravisteltu.



Kuva 8. Ale-hiivalle tehdyn toistokokeen tulokset ravistelulla.

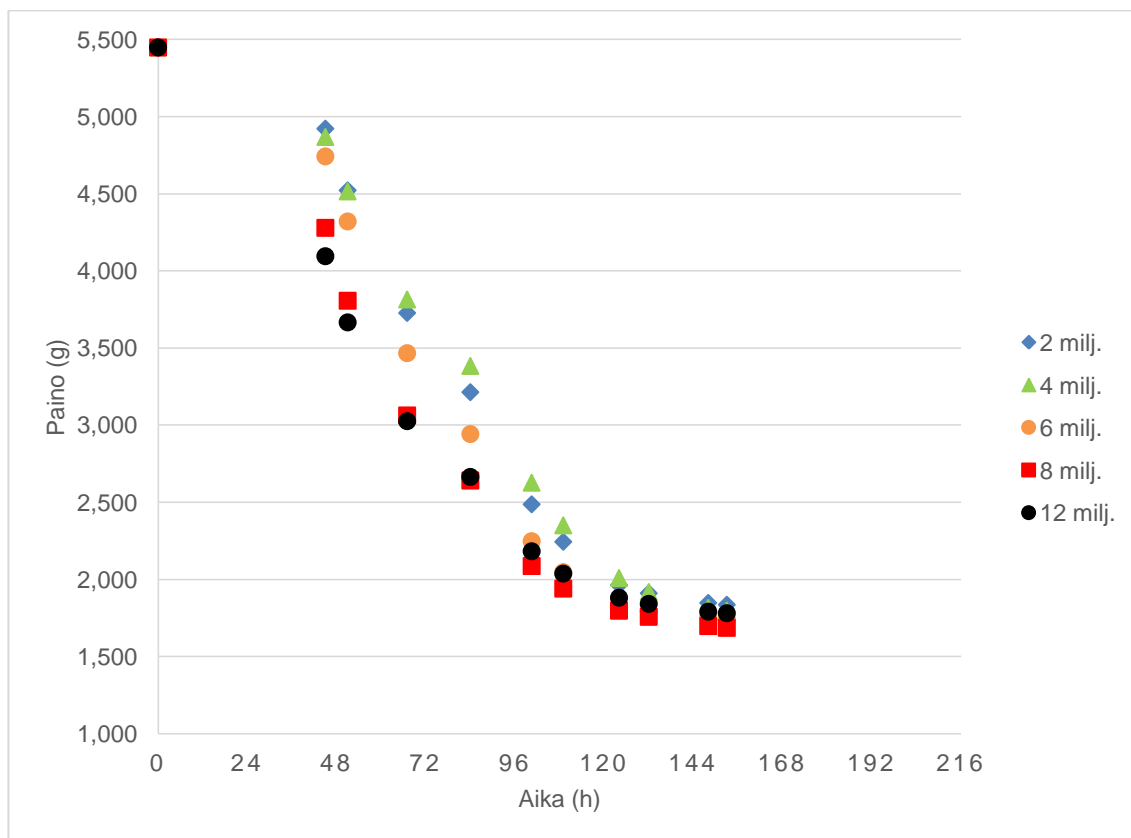
Ale –kokeiden tuloksia tarkastelemalla voidaan todeta, että pienimmällä hiivamäärällä käyminen on hitaampaa, mutta käyminen etenee kuitenkin suunnilleen yhtä pitkälle. Ensimmäisessä kokeessa ravistelussa olleet pullot kävivät pidemmälle kuin toisessa kokeessa, missä ravistelemattomat pullot kävivät pidemmälle. Kokeiden kesto ei ollut yhtä pitkä, joten tuloksia ei voi suoraan verrata toisiinsa.

Ensimmäinen Lager-koe (kuva 9) lähti käyntiin hitaasti, mutta 60 tunnin kohdalla lag-vaiheen jälkeen käyminen oli hyvin nopeaa. 8 miljoonaa solua/ml sisältänyt pullo kävi nopeiten ja myös pisimmälle. 12 miljoonaa solua/ml sisältäneen pullon käymisnopeus hidastui käymisen edetessä ja noin 4 vuorokauden kohdalla se oli lähestulkoon samassa käymisasteessa kuin 2 miljoonaa solua/ml sisältänyt pullo. Kokeen lopussa 2, 4, 6 ja 12 milj. solua/ml sisältäneet pullot olivat saavuttaneet lähes saman käymisasteen ja 8 milj. solua/ml sisältänyt pullo oli käynyt pisimmälle.



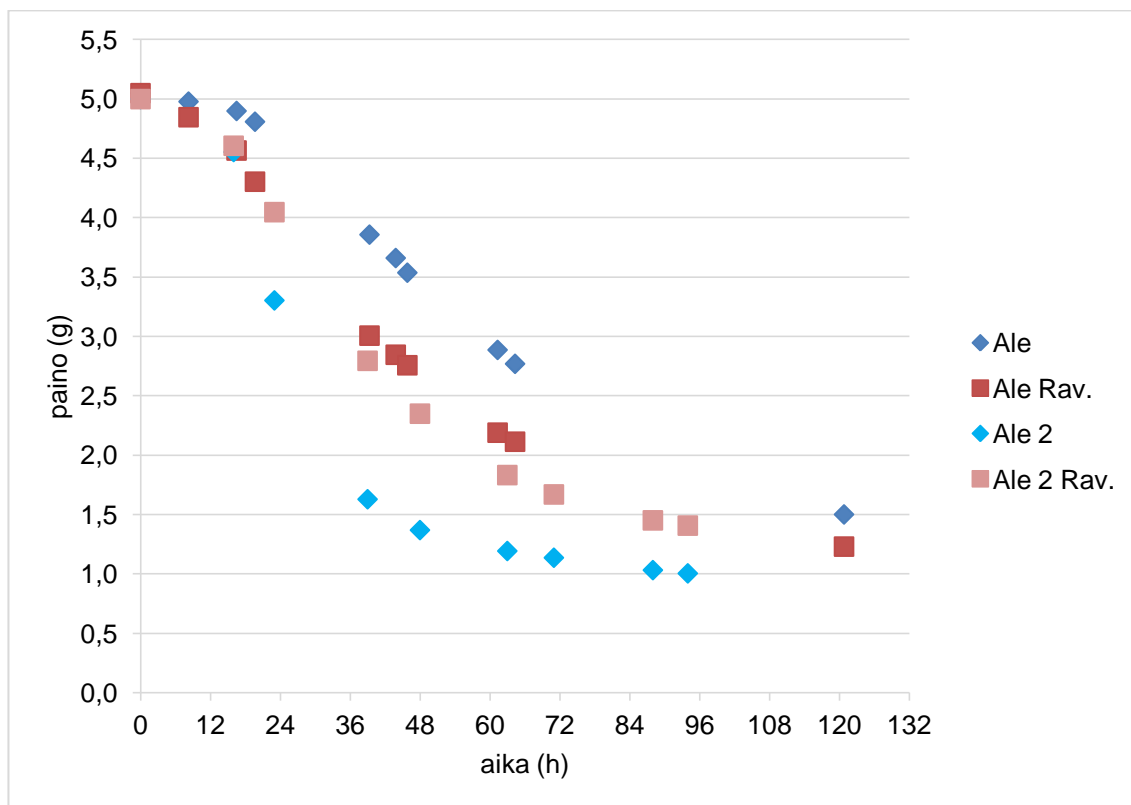
Kuva 9. Lager-hiivan käymiskokeen tulokset

Toisen Lager-kokeen (kuva 10) käymiskäyrä oli erilainen; pullot lähtivät käymään nopeammin, mutta kävivät hitaammin. 8 ja 12 milj. solua/ml sisältäneet pullot kävivät samaa vauhtia ja yhtä pitkälle. 6 milj. solua/ml sisältänyt pullo saavutti 8 ja 12 milj. solua/ml sisältäneet pullot neljän vuorokauden kohdalla päätyen samoihin käymisasteisiin.



Kuva 10. Lager-hiivalle tehdyn toistokokeen tulokset.

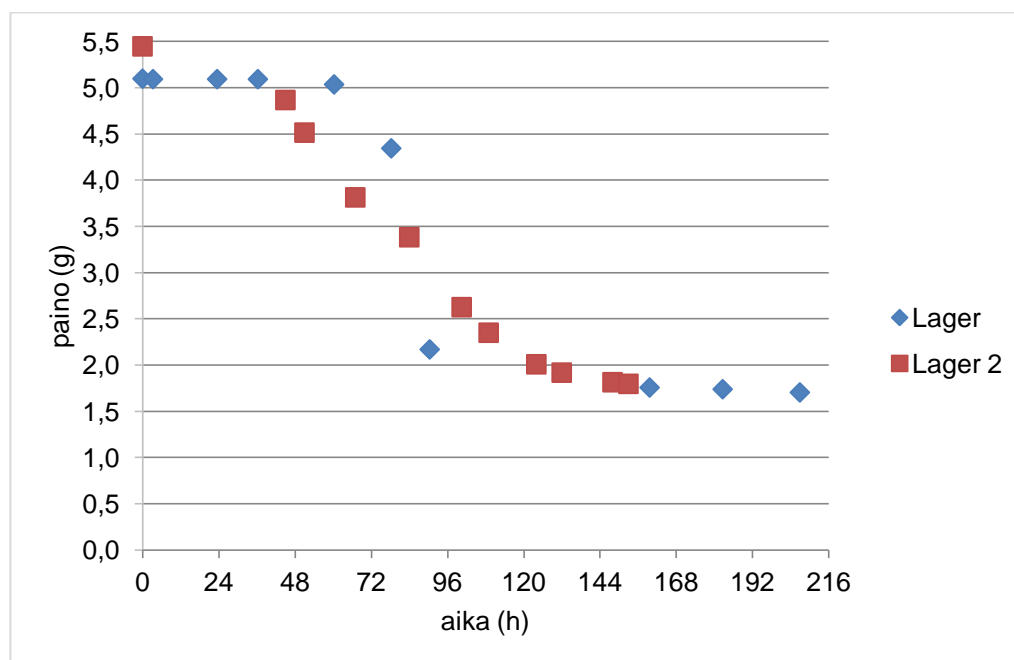
Kuvassa 11 ja 12 on esitetty ale- ja lager-hiivoilla tehdyistä kokeista niiden pullojen tulokset, joiden hiivausmäärä oli lähimpänä Stadin Panimon käyttämiä hiivausmääriä. Ale-hiivan hiivausmäärä oli sama, 3 milj. solua/ml ja lager-hiivan hiivausmäärä oli 4 milj. solua/ml, mikä on  $\frac{1}{2}$  milj. solua/ml pienempi kuin Stadin Panimon käyttämä hiivausmäärä.



Kuva 11. Ale-hiivan käymiskokeiden tulosten vertailu.

Kuvaa 11 tarkastelemalla nähdään, että ravistelussa olleet 1. ja 2. ale-hiivan käymiskokeen hiilidioksidin haihtuminen (käyminen) on ollut lähes yhtä nopeaa, käyminen on alkanut yhtä aikaa ja jatkunut toisiinsa nähden tasaisena loppuun asti. Ale-hiiva pullot, jotka eivät olleet ravistelussa, ovat käyneet eri nopeudella. Toisen käymiskokeen pullo on käynyt huomattavasti nopeammin: sen painosta oli 48 tunnin jälkeen poistunut hiilidioksidia 3,63 grammaa, kun ensimmäisen kokeen pullosta oli 46 tunnin jälkeen poistunut 1,34 grammaa ja kesti vielä 75 tuntia, että jälkimmäisestä oli haihtunut yhteensä 3,5 grammaa.





Kuva 12. Lager-kokeiden vertailu.

Lager-hiivojen käymiset (kuva 12) näyttävät kuvaajassa myös erilaiselta, ensimmäisen kokeen lag-vaihe kestää 60 tuntia, kun toisen kokeen lag-vaihe on ohi jo 45 tunnin kuluttua kokeen aloittamisesta. Pitkän lag-vaiheen jälkeen 1. lager-koe käy nopeasti ja on 90 tunnin kuluttua käynyt pidemmälle kuin 2. koe. 6–7 vuorokauden kuluttua kokeen alkamisesta molempien käyminen näyttää pysähtyneen samalle tasolle. Kun otetaan huomioon toisen kokeen korkeampi kantavierrepitoisuus (10,2 ja 10,9 °P) on sen käymisaste pienempi.

Kuvien 11. ja 12 kokeiden vertailun pohjalta koeasetelman toistettavuudesta voidaan tehdä havainto, että ravistelemattomien pullojen käymiset eivät ole yhtä toistettavia kuin ravisteltujen pullojen. Käymiskokeiden näytteidenottoajankohdat poikkeavat toisistaan ja ensimmäisissä ja toisissa käymiskokeissa oli käytössä eri kasvatusalusta. Rinnakkaisia määrittäksiä olisi täytynyt olla enemmän kunnollisen tilastollisen merkittävyyden toteamiseksi ja useiden hiivausmäärien sijaan molemmilla hiivoilla voitaisiin keskittyä yhteen hiivausmäärään. Täten käymiskokeiden tulokset ovat vain suuntaa antavia ja asian selvittäminen vaatii jatkotutkimuksia. Kokeissa oli käytössä eri hiivaerä ja niiden säilytysolosuhteet ja fysiologinen tila ovat voineet vaihdella. Hiivan fysiologinen tila voi mahdollisesti olla syy, miksi 1. ja 2. lager-hiivan käymisten lag-vaiheiden kesto on erilainen.

## 7 Yhteenveto

Tämän insinööriyön tavoitteena oli selvittää nestehiivan käyttöönottoa Stadin Panimo Oy:ssä. Ensimmäisessä kokeellisessa osassa selvitettiin, miten pienpanimossa voitaisiin kasvattaa riittävän suuri hiivasuspensio mahdollisimman yksinkertaisella prosessilla. Toisessa osassa selvitettiin kahden valitun hiivakannan solumäärän vaikutusta vierteen käymisnopeuteen.

Kasvatuskokeiden perusteella riittävän hiivamäärän kasvattaminen panimolla on mahdollista. Riippuen kasvatuksen alussa olevan solumäärän suuruudesta, kasvatus voidaan suorittaa kahdessa tai jopa yhdessä vaiheessa. Käytettävä menetelmä riippuu Stadin Panimon resursseista kasvatustankkien ja muun laitteiston hankintaan. Mikroskoopilla, hemosytometrillä ja metyleenisini-värjäyksellä hiivan solumäärää ja elävyyttä voidaan tarkkailla tarkan hiivausmäärän saavuttamiseksi ja hiivan kunnon seuraamiseksi.

Tehtyjen käymiskokeiden perusteella hiivausmäärällä oli vaikutus pullojen käymisnopeuteen eron ollessa suurimmillaan käymisten alussa ja keskivaiheilla. Ravistelulla oli myös vaikutus käymisnopeuteen; ravistellut pullot kävivät nopeammin. Koesarjojen välillä oli kuitenkin eroavaisuuksia ravisteltujen ja ravistelemattomien pullojen käymisnopeuden välillä. Käymisasteeseen hiivamäärä ei juurikaan vaikuttanut, mutta johtuen toistokokeiden pienestä määrästä ja suuresta keskihajonnasta, tuloksista ei tehty tilastollista analyysia tilastollisen merkitsevyyden todentamiseksi. Tämän johdosta kokeiden tulos on vain suuntaa antava ja asia vaatii jatkoselvitystä. Mainittakoon myös, että hiivasolujen määrällä vierteessä on vaikutusta oluen flavoriin, joten hiivausmäärän kasvattamista käymisen nopeuttamiseksi on harkittava niissä rajoissa, missä oluen flavori pysyy haluttuna. Flavorin muodostuksen lisäksi on otettava huomioon oluen kantavierepitoisuuden ja käymislämpötilan vaikutukset.

Tässä insinööriyössä ei tutkittu hiivan mikrobiologisen puhtauden varmistamista. Hiivan mikrobiologisen puhtauden voidaan kuitenkin sanoa olevan hyvin merkittävä, jopa välttämätön osa hiivan kierrätystä. Kasvatusmaljojen valmistus ja viljely villihiivojen sekä maitohappobakteereiden havaitsemista varten vaatii kuitenkin omat laitehankintansa ja henkilöstön koulutuksen.

## Lähteet

Aittomäki, Esa, Eerikäinen, Tero, Leisola, Matti, Ojamo, Heikki, Suominen, Ilari & von Weyerman, Niklas. 2002. Bioprosessitekniikka. WSOY. Helsinki.

Briggs ym., Dennis E. Boulton, Chris A. Brookes, Peter A & Stevens, Roger. 2004. Brewing Science and Practice. Woodhead Publishing, Englanti.

Enari, T-M. Mäkinen, V. 2015. Panimotekniikka. Kirjapaino tt, Porvoo.

Huttunen, Timo. Mäentausta, Olli ym. 2010. Elintarvikeprosessit. Savonia-ammattikorkeakoulu, Kuopio.

Hornsey, Ian S. 1999. Brewing. The Royal Society of Chemistry, UK.

Walker, Graeme M. 1998. Yeast Physiology and Biotechnology. Wiley, Englanti.

Lewis, Michael J. Bamforth, Charles W. 2006. Essays in Brewing Science. Springer.

Markkula, Tuomas. 2007. Oluen Valmistaminen. Kurssimateriaali, Oluenvalmistuskurssi, Avoin HAMK.

Adams, Martin R. Moss, Maurice O. 2008. Food Microbiology. RSC Publishing.

Silja Home. 2012. Ohrasta oluen synty. Verkkodokumentti.  
<[http://www.agronet.fi/mallasohra/oo5mita\\_ohranjyvalle\\_mallastuksessa.htm](http://www.agronet.fi/mallasohra/oo5mita_ohranjyvalle_mallastuksessa.htm)>. 12.03.2012. Luettu 26.11.2014.

Eblinger, Hans M. Narzib, Ludwig. 2009. Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Beer. s. 177–220. Wiley. PDF-dokumentti.

Technical Information: Pitch Rates. 2015. Wyeast Laboratories. Verkkodokumentti.  
<<http://www.wyeastlab.com/com-pitch-rates.cfm>>. Luettu 26.1.2015.

Markkula, Tuomas. 2014. Oluenvalmistuskurssi-luennot, 4 op. Avoin HAMK, Mustiala. Suoritettu 16.12.2014.

Sohigian, David. 1998. American Brewers Guild, Practical Yeast Management in the Brewpub. PDF-dokumentti.

Gren, Sebastian. 2015. Panimovastaava, Stadin Panimo Oy, Helsinki. Keskustelu 5.5.2015.

Source of Brewer's Yeast. 2015. University of Leeds. Internetlähde.  
<[http://www.virtual-labs.leeds.ac.uk/brewing/brewers\\_yeasts.php](http://www.virtual-labs.leeds.ac.uk/brewing/brewers_yeasts.php)>. Luettu 5.5.2015.

Whitelabs. 2015. Yrityksen kotisivut. <<http://www.whitelabs.com/>>. Luettu 5.5.2015.

Lallemand Danstar. 2015. Yrityksen kotisivut. <<http://www.danstaryeast.com/>>. Luettu 5.5.2015.

Wyeast. 2015. Yrityksen kotisivut. <<https://www.wyeastlab.com/>>. Luettu 5.5.2015.

Fermentis. 2015. Yrityksen kotisivut. <<http://www.fermentis.com/>>. Luettu 5.5.2015.

Stadin Panimo. 2015. Yrityksen kotisivut. <<http://www.stadinpanimo.fi/panimo/>>. Luettu 6.5.2015

White, Chris. Zainasheff, Jamil. 2010. Yeast. The Practical Guide to Beer Fermentation. Brewers Publications.

Starch Conversion. Enzymatic starch breakdown 2010. Internetlähde.  
<[http://braukaiser.com/wiki/index.php?title=Starch\\_Conversion/](http://braukaiser.com/wiki/index.php?title=Starch_Conversion/)>. Luettu 13.10.2015.

Palmer, J. John. 2006. How to Brew. Brewers Publications.

## Hiivanäytteen solumäärän ja elävyyden määrittäminen

Hiivasuspension solumäärän mittaamista varten näyte on laimennettava. Jos näytteessä on liian vähän soluja, tulokset eivät ole luotettavia. Jos soluja on liian paljon, Hemosytometrin kammio on liian täynnä eikä saada laskettua tarkkaa tulosta. Suspensiota tarkkaillaan mikroskoopilla hemosytometrissä ennen laimennosten tekemistä. Näin voidaan arvioida tarvittavan laimennoksen suhde. Taulukossa 1 on esitetty karkeat laimennos-suhteiden kokoluokat eri näytteille. [White & Zainasheff 2010: 245.]

Taulukko 1. Laimennostarpeet eri hiivanäytteille. [White & Zainasheff 2010: 245.]

Olut	Ei laimennosta
Käyvä olut	1:10 tai 1:100
Hiivasuspensio	1:1000

### Materiaalit

- Mikroskooppi, missä vähintään 400x suurennos, sisäänrakennettu kokoojalinssi, säädettävä valaistus ja himmennin sekä x/y-akselilla liikuteltava näytetaso.
- Hemosytometri
- Hemosytometrin päällyslasi
- Hienokärkinen lasi-pipetti
- Käsilaskuri
- Siirtopipettejä
- Nukkaamattomia papereita
- Metyleeninisininen-liuosta
- Koeputkia
- Pumpetti

### Näytteen valmistelu

1. Laimenna näyte niin, että yhdessä 5x5 –ruudukossa on alle 100 solua. Kirjoita laimennos-suhde ylös.
2. Laimenna näyte tislattulla vedellä. Yhteen flokkaantuneet hiivasolut haittaavat mittausta, joten yritä ravistaa näytettä voimakkaasti. Näyte voidaan myös laimentaa 0,5 %:lla rikkihappo-liuoksella tai lisätä näytteen joukkoon EDTA-liuosta. Lisätäkseen EDTA-liuosta, sentrifugoi hiivasuspensio ja dekantoi pois ylimääräinen neste. Korvaa poistettu neste samalla määrällä EDTA-liuosta.

3. Jos määritetään myös elävyys, viimeinen laimennos tehdään sekoittamalla 1 ml näytettä 1 ml:aan metyleeninsinistä. Ota laimennos huomioon laskuissa. Sekoita näyte hyvin ja anna vaikuttaa 1–2 minuuttia.
4. Sekoita näyte huolellisesti ennen hemosytometriin siirtämistä. Vältä kuplien muodostumista.

#### Näytteen mittaaminen

1. Varmista että hemosytometri on puhdas ja kuiva. Käytä kuivaamisen nukkaamatonta paperipyyhettä.
2. Aseta päällyslasi hemosytometrin kammioiden päälle tasaisesti.
3. Kerää hyvin sekoitettua näytettä hienokärkisellä lasipipetillä. Anna näytteen nousta pipettiin kapillaari-voiman avulla. Pyyhi ylimääräiset nesteet pois pipetin ulkopinnalta.
4. Aseta pipetin kärki varovasti hemosytometrin päällyslasin reunaan. Injektoi näyte varovaisesti päällyslasin ja hemosytometrin kammion väliin. Vältä yli- tai alitäyttämästä. Jos kammio täyttyy yli/epätasaisesti tai siinä näkyy ilmakuplia, putsaahasemosytometri ja täytä se uudelleen.
5. Aseta hemosytometri varovaisesti mikroskoopin näytealustalle. Tarkastele suurella suurennoksella solujen jakaantumista ruudukoihin. Jos solut ovat jakaantuneet tasaisesti, voidaan solut laskea viidestä ruudusta. Jos solut ovat kasaantuneet epätasaisesti, lasketaan solut kaikista ruuduista tai valmistetaan uusi näyte. Jos soluja on liian paljon (>100/5x5 ruudukko) tai liian vähän (<25/5x5 ruudukko), valmista uusi näyte. Ideaalisesti soluja olisi 50/5x5 ruudukko.
6. Laske soluja 1 mm<sup>2</sup> kokoiselta laskualueelta, missä on 5x5 – ruutua. Määritä ennen laskemista laskuprotokolla, minkä mukaan solut lasketaan. Esimerkiksi laske jokaisen ruudun vasemman reunan sekä alareunan päällä makaavat solut, mutta jätä laskematta oikean reunan ja yläreunan päällä makaavat solut. Äitisolusta kuroutuvat solut lasketaan vain jos ne ovat vähintään puolet äitisolun koosta.
7. Jos määritetään näytteen elävyys, värjäytyneet solut lasketaan ensin mukaan kokonaislukuun. Tämän jälkeen värjäytyneistä (kuolleista) soluista lasketaan oma luku. Kuolleet solut ovat värjäytyneet tummansinisiksi. Kuroutuvat ja jotkin nuoret solut, jotka ovat värjäytyneet vaaleansinisiksi, eivät ole kuolleita.
8. Laskettujen ruudukkojen tuloksesta lasketaan keskiarvo, joka kuvaa kuinka monta solua on yhdessä kammiossa keskimäärin. Jokaisen kammion tilavuus

on tunnettu. Tämän avulla voidaan laskea solujen lukumäärä per. ml näytettä sekä kuolleiden solujen prosentuaalinen osuus.

9. Solumäärä lasketaan kaavalla 1.

$$\frac{\text{solua}}{\text{ml}} = \frac{\text{kammioiden solumäärän ka}}{\text{kammion tunnettu tilavuus ml:na}} \times \text{laimennuskerroin} \quad (1)$$

10. Elävyys lasketaan jakamalla kuolleiden solujen määrä kokonaissolumäärällä.

$$\text{Elävyys \%} = \frac{\text{kuolleet solut}}{\text{kaikki solut}} \times 100 \quad (2)$$

Kammioita saattaa olla eri laatuksia ja kammioiden koko saattaa vaihdella. On suositeltavaa aina perehtyä hemosytometrin mukana tulleisiin käyttöohjeisiin.

## **Elinkyky-testit hiivalle**

### **1. Hapattamiskyky-testi (HK)**

Mitä nopeammin hiiva happamoittaa ravintoalustansa, sitä elinkykyisempää se on. Testi voidaan suorittaa talteenotetulle ja säilytetylle hiivalle.

Testissä tarvittavat materiaalit ovat:

- pH mittari
- Ionivaihdettua vettä
- 50 ml näyteputki
- magneettisekoitin
- 20% glukoosi-liuos

Testin suoritus:

1. Kalibroi pH-mittari käyttämällä kahta kalibrintiliuosta (4 ja 7 pH).
2. Säädä veden pH maitohapolla arvoon  $6,5 \pm 0,1$ .
3. Kaada 15 ml pH-säädettyä vettä koeputkeen missä on sekoitin.
4. Seuraa veden pH:ta 5 minuutin ajan koko ajan sekoittaen.
5. 5 minuutin kuluttua kirjaa pH ylös (HK0). Lisää 5 ml huuhdeltua ja konsentroitua hiivasuspensiota ( $1 \times 10^9$  solua/ml).
6. Sekoita 10 minuutin ajan ja kirjaa pH ylös (HK10)
7. Lisää 5 ml 20% glukoosi-liuosta, sekoita 10 minuuttia ja kirjaa ylös pH (HK20). Hapattamiskyky on HK20:n ja HK0 erotus. Mitä suurempi ero on, sitä elinkykyisempää hiiva on.

### **2. Fermentointi-testi**

Hiivan käyttäytymistä käymislämpötilojen ja hiivausmäärän suhteen voidaan testata laboratoriomittakaavan fermentointikokeilla. Kokeessa otetaan talteen n. 1,5 l panimon normaalia keitettyä ja humaloitua vierrettä. Vierre jäähdytetään haluttuun lämpötilaan ja siihen lisätään tarkkaan määritelty määrä hiivaa. Fermentointia seurataan uutepitouksen muutoksen ja pH:n avulla. Lämpötilaa kontrolloidaan ja tarkkaillaan tarkasti. Tapahtuneet muutokset ja olosuhteet kirjataan ylös 7 päivän ajalta. Mittauksista saa-



daan graafinen kuva hiivan käymisasteesta käymisolosuhteiden ja ajan suhteen. Fermentointikokeen avulla voidaan optimoida fermentointeja hiivausmäärän ja lämpötilan suhteen. Koe mahdollistaa myös vierteen analysoinnin käymisen jälkeen muun muassa värin, katkeruuden ja flavorin suhteen.

### Hiivan kasvunopeuden ja generaatioajan laskeminen

Yksisoluisten hiivojen spesifistä kasvunopeutta voidaan mitata solumäärän avulla eksponentiaalisen kasvun aikana. Spesifinen kasvunopeus,  $\mu$  lasketaan kaavalla 1. [Aittomäki, ym. 2002: 127-128].

$$\mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t} \quad (1)$$

Missä  $X$  = solujen lukumäärä (kpl / ml)

$t$  = kasvatusaika (h)

Solujen generaatioaika, eli kaksinkertaistumisaika lasketaan kaavalla 2. [Aittomäki, ym. 2002: 127-128].

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (2)$$